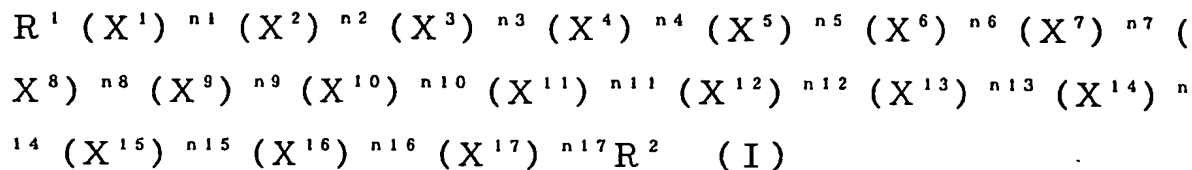




(51) 国際特許分類6 C07K 14/82 // C12N 15/09, A61K 38/17	A1	(11) 国際公開番号 WO98/51707 (43) 国際公開日 1998年11月19日(19.11.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02148 (22) 国際出願日 1998年5月15日(15.05.98) <i>15 Nov 98 / 30 min</i> (30) 優先権データ 特願平9/126113 1997年5月15日(15.05.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 柴田健志(SHIBATA, Kenji)[JP/JP] ✓ 〒206-0041 東京都多摩市愛宕1-630-9 Tokyo, (JP) 山崎基生(YAMASAKI, Motoo)[JP/JP] ✓ 〒194-0021 東京都町田市中町3-9-13 Tokyo, (JP) 吉田哲郎(YOSHIDA, Tetsuo)[JP/JP] ✓ 〒194-0022 東京都町田市森野4-17-17 Tokyo, (JP) 水上民夫(MIZUKAMI, Tamio)[JP/JP] ✓ 〒194-0032 東京都町田市本町田2141-69 Tokyo, (JP)		新海暁男(SHINKAI, Akeo)[JP/JP] ✓ 〒194-0021 東京都町田市中町3-9-11 Tokyo, (JP) 穴澤秀治(ANAZAWA, Hideharu)[JP/JP] ✓ 〒178-0064 東京都練馬区南大泉4-19-18 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: PEPTIDES HAVING CYCLIC STRUCTURES AND EXERTING P53 PROTEIN ACTIVITY-RESTORING EFFECT ON P53 PROTEIN MUTANTS (54) 発明の名称 変異P53蛋白質に対してP53蛋白質が有する活性を回復させる環状構造を持つペプチド (57) Abstract Peptides having cyclic structures represented by the following general formula (I): $R^1(X^1)^{n1}(X^2)^{n2}(X^3)^{n3}(X^4)^{n4}(X^5)^{n5}(X^6)^{n6}(X^7)^{n7}(X^8)^{n8}(X^9)^{n9}(X^{10})^{n10}(X^{11})^{n11}(X^{12})^{n12}(X^{13})^{n13}(X^{14})^{n14}(X^{15})^{n15}(X^{16})^{n16}(X^{17})^{n17}R^2$ and exerting the effect of restoring a P53 protein activity on P53 protein mutants or pharmacologically acceptable salts thereof. In said formula (I) X^i means an arbitrary member selected from among X^1 to X^{17} while n^i means an arbitrary member selected from among n^1 to n^{17} (provided that i is an integer of from 1 to 17), then X^i represents an amino acid residue or an organic acid residue; a functional group in a residue X^p selected among X^1 to X^{11} (provided that p is an integer of from 1 to 11) and a functional group X^q selected from among X^8 to X^{17} (provided that q is an integer of from 8 to 17 and larger than p) form a cyclic structure having a crosslinkage selected from among S-S, S-CH ₂ -S, S-CH ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₂ -S, S-CH ₂ -CO, CO-NH, NH-CO, O-CO or CO-O; R^1 represents optionally substituted alkanoyl, etc.; and R^2 represents optionally substituted alkoxy, etc.		

(57)要約

本発明は、一般式 (I)



{式中、 $X^1 \sim X^{17}$ および $n1 \sim n17$ の任意の位置をそれぞれ X^i および n_i (但し、 i は $1 \sim 17$ の整数から選ばれる) で表す。 X^i はアミノ酸または有機酸の各残基を表す。各配列中、 $X^1 \sim X^{11}$ から選ばれる残基 X^p (但し、 p は $1 \sim 11$ から選ばれる) における1官能基と $X^8 \sim X^{17}$ から選ばれる残基 X^q (但し、 q は $8 \sim 17$ から選ばれ、 $p < q$ であり、環状構造における架橋結合は $S-S$ 、 $S-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-C_6H_4-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-CO$ 、 $CO-NH$ 、 $NH-CO$ 、 $O-CO$ 、または $CO-O$ 結合から選ばれる) における1官能基によって環状構造が形成されているものとする。 R^1 は置換もしくは非置換アルカノイル等を、 R^2 は置換もしくは非置換アルコキシ等を表す。} で表され、変異P53 蛋白質に対してP53 蛋白質が有する活性を回復させる環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルギナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BS バルルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン

FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサウ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI ジヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ

LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア
共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア

SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴェトナム
YU ユーゴスラビア
ZW ジンバブエ

明 細 書

変異P53 蛋白質に対してP53 蛋白質が有する活性を回復させる 環状構造を持つペプチド

技 術 分 野

本発明は、変異P53 蛋白質に対してP53 蛋白質が有する活性を回復させる環状構造を持つペプチドおよびその薬理的に許容される塩に関する。すなわち、該ペプチドは、ヒト P53 蛋白質の C 末端近傍の配列、あるいはその一部に変異を導入した配列をその主要な構造とし、点変異によって特異的 DNA との結合能力を失った変異 P53蛋白質 に結合してその特異的 DNA に対する結合活性を回復させる。さらに該ペプチドは P53蛋白質 依存性の転写活性を回復させるため癌の治療薬として有用である。

技 術 背 景

遺伝子 p53 は、ヒト癌においてもっとも高頻度で変異が見いだされている癌抑制遺伝子である。その変異は乳癌、大腸癌、肺癌をはじめ、殆どの癌種で見いだされており、全ての癌患者の 50 % 以上で p53 遺伝子の変異が存在すると考えられている〔サイエンス (Science) , 253 巻, 49 頁 (1991 年) 〕。また、多くの種類の癌において、p53 の変異の有無と、悪性度、予後経過、転移の有無等に相関があることが知られており、p53 を欠失したマウスに癌が頻発することからも、p53 が発癌抑制に重要な機能を果たしていることは明らかである〔ネイチャー (Nature) , 356 巻, 215 頁 (1992 年) 〕。

遺伝子 p53 の主要な生物学的役割は、細胞が DNA 損傷を受けた際に、1) 細胞を G1 期に停止させる、2) アポトーシス (細胞死) に向かわせる、等であり、癌細胞に見られる変異型 p53 ではこれらの能力が失われている。近年、正常 P53 蛋白質 (以後 P53 は遺伝子 p53 が発現した蛋白質の意味で用いる) は、特定の塩基配列に結合して転写を活性化する転写制御因子として機能することが明らかになってきた〔セル (Cell) , 78 巻, 543 頁 (1994

年)〕。P53 によって転写活性化される遺伝子としては、CDK インヒビターの p21waf1、GADD45、bax 等が知られており、細胞を G1 停止やアポトーシスに導くのに重要な機能を果たすと考えられている〔セル(Cell), 75 巻, 817 頁 (1993 年)、同, 71 巻, 587~597 頁 (1992 年)、同, 80 巻, 293 頁 (1995 年)〕。

こうした DNA 結合活性、転写活性化活性を失っている変異 p53/P53 を有する癌細胞に働きかけて、上記活性を回復させ結果として癌を抑制する方法としては、野生型 p53 遺伝子を細胞に戻す遺伝子治療の試みがある。実際に、ヒト肺癌、頭頸部癌等のマウス移植腫瘍に対して野生型 p53 遺伝子の導入が、単独投与あるいは既存抗癌剤との併用で、有効であると報告されている〔キャンサー・リサーチ (Cancer Research), 54 巻, 2287 頁 (1994 年)、同, 55 巻, 1 頁 (1995 年)〕。また、ヒト非小細胞肺癌においても野生型 p53 遺伝子の直接導入が有効であると最近報告され、細胞内の p53/P53 の活性を回復させることが癌に対して臨床的に有効であることが明らかにされた〔ネイチャー・メディシン (Nature Med.), 2 巻, 985 頁 (1996 年)〕。しかし、遺伝子治療に付随する制約も大きく、p53/P53 に変異を有する細胞に p53/P53 の活性を回復させるためのより簡便ですぐれた方法が求められている。

遺伝子 p53 における変異は他の癌抑制遺伝子に見られる変異とは異なり、その多くがミスセンス (点) 突然変異であり、欠失・挿入突然変異は少ない。1 アミノ酸の置換により P53 の高次構造上の変化が起きるために、上記の特異的な DNA の塩基配列に結合する活性および転写を活性化する活性が共に失われており、その結果として DNA 損傷時の細胞の G1 期停止、アポトーシス誘導が起こらなくなっていると考えられている〔サイエンス (Science), 256 巻, 827 頁 (1992 年)〕。ヒト癌で見られる p53 のミスセンス突然変異の約 90 % は 11 のエクソンのうちのエクソン 5~8 (コドン 126~306

）に局在しており、なかでもコドン 143、175、245、248、249、273、282 等はホットスポットとよばれ、発癌部位によってその頻度は少しずつ異なるものの多くの変異が集中している〔*バイオケミカ・ビオフィジカ・アクタ* (*Biochemica Biophysica Acta*) 1155 巻, 181 頁 (1993 年)、*キャンサー・リサーチ* (*Cancer Research*) 54 巻, 4855 頁 (1994 年)〕。P53 の DNA 結合領域の X 線結晶構造解析の結果から、これらホットスポットに見られるアミノ酸置換は、1) DNA 鎖の塩基あるいはバックボーンに直接作用する残基 (コドン 248、273 等) の変異、および 2) DNA 結合領域の構造の安定化に寄与する残基 (コドン 143、175、249、282 等) に生じるものであると考えられている〔*サイエンス* (*Science*), 265 巻, 346 頁 (1994 年)〕。これら DNA 結合領域に見られる点変異は、1)、2) いずれの場合も、P53 の塩基配列特異的 DNA 結合活性を失わせる。従って、これら点突然変異あるいはその他の変異によって特異的 DNA 結合活性を失っている P53 に相互作用して、その DNA 結合活性を回復させることが可能な物質は抗腫瘍活性を有することが期待される。

変異 P53 の DNA 結合を回復させる物質としては、P53 の C 末端近傍の配列をエピトープとするモノクローナル抗体 Pab421、大腸菌の熱ショック蛋白質 DnaK が報告されている〔*ヌクレイック・アシッド・リサーチ* (*Nucleic Acids Research*), 21 巻, 3167 頁 (1993 年)〕。また、最近、変異 P53 の DNA に相互作用している残基にさらに変異を加える (284Thr を Arg に変異) ことで、一部の変異 p53 の DNA 結合活性が回復することが示された〔*ネイチャー・メディスン* (*Nature Medicine*), 2 巻, 1143 頁 (1996 年)〕。Pab421 の導入、および Arg284 の変異の導入により、一部の変異 p53 蛋白質に関しては転写活性化能も回復しうることが報告されている〔*キャンサー・リサーチ* (*Cancer Research*) 55 巻, 3490 頁 (1995 年)、*ネイチャー・メディスン* (*Nature Medicine*) 2 巻, 1143 頁 (1996 年)〕。これらの結果は、変異

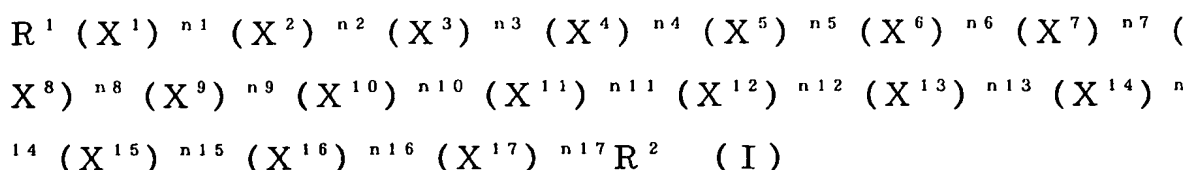
P53 に直接作用して DNA 結合を回復させることで、転写活性化活性も回復させ、抗腫瘍活性をもたせることが可能であることを示唆している。そうした活性を有する低分子化合物については、ゲルダナマイシン (Geldanamycin) が細胞内で変異p53のコンフォメーションを変化させDNAへの特異的結合を部分的に回復させるという報告があるが、その作用は間接的であり、おそらくは HSP90 蛋白質を介していると考えられている〔オンコジーン (Oncogene) 11 巻, 933 頁 (1995 年)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proceedings of the National Academy of Science USA) 93 巻, 8379 頁 (1996 年)〕。また、エリブチシンが P53 のりん酸化に寄与する酵素を阻害する活性をもち、これにより癌細胞で大量に発現している変異型 P53 のりん酸化を阻害することによって選択的に癌細胞のアポトーシスを誘起させるという報告がある (特開平 6-279441 号公報)。

P53 の有する転写活性化の制御機構としては、C末端の 30 アミノ酸を欠失させることで野生型 P53 のDNA結合活性が高まることから、C末端の塩基性に富む配列がアロステリックに活性を負に制御していると考えられている〔ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 21 巻, 3167 頁 (1993 年)、ネイチャーメディスン (Nature Medicine), 2 巻, 1143 頁 (1996 年)〕。また、このC末端の配列は変異 P53 の DNA 結合活性を回復させる上記のモノクローナル抗体 Pab421 のエピトープであることから、C末端の配列が分子内、あるいは分子間で P53 の DNA 結合領域と相互作用することで、その DNA 結合活性を抑制していることが推測される。実際、このエピトープ部分を含む P53 のC末端近傍由来のペプチドについては、12~15 アミノ酸残基よりなるペプチドが、大腸菌または酵母で発現させた野生型 P53 の DNA 結合能力を高めるという報告が最近なされている〔セル (Cell), 83巻, 237 頁 (1995年)、オンコジーン (Oncogene), 12巻, 921 頁 (1996

年)〕。また最近、P53 のC末端近傍 13 アミノ酸残基よりなるペプチド (コドン 371-383) が、コドン 273 が His に変異したヒト P53 (以下 P53His273 と記述) の *in vitro* の特異的 DNA 結合活性を一部回復させるという報告がなされた (特許国際公開 WO 96/25434 号)。ペプチド濃度が 0.4 mM と極めて高濃度での結果であり、実際の細胞内の変異 P53 の活性を回復させるという結果は得られておらず、このペプチドの His273 以外の変異 P53 に対する効果も明らかではない。細胞内でこのペプチドが変異 P53 の転写活性、増殖抑制活性を回復させるかどうか不明である。さらに最近になって、P53 のC末端近傍よりなるペプチド (コドン 369-382) の一個所のリジンを (Lys381 に相当する) ポリエチレングリコール (PEG) 化修飾したものを、ヒト大腸癌由来細胞株 SW480 (273Arg が His に、また 309Pro が Ser となった変異を有する) にマイクロインジェクションしたところ、該細胞由来の P53 の転写活性が回復したという報告がなされた [オンコジーン (Oncogene)、13 巻、2477 頁 (1996 年)]。

発 明 の 開 示

本発明は、一般式 (I)



{式中、 $X^1 \sim X^{17}$ および $n_1 \sim n_{17}$ の任意の部分それぞれ X^i および n_i (但し、 i は 1~17 の整数から選ばれる) で表す。 X^i は以下に示すアミノ酸または有機酸の各残基を表す。 n_i は 0 または 1 を表し、 $(X^i)^{n_i}$ は、 $n_i = 1$ である場合、 X^i それ自身を表し、 $n_i = 0$ である場合、結合を表す。 $n_i = 1$ である 7~17 個の異なる X^i を選択し、選択された X^i を i の小さい順に並べて結合させ N 末端に R^1 を、C 末端に R^2 を結合させることによって一つの配列を表す。各配列中、 $X^1 \sim X^{17}$ から選ばれる残基 X^p (但し、

pは1～11から選ばれる)における1官能基と $X^8 \sim X^{17}$ から選ばれる残基 X^q (但し、qは8～17から選ばれ、 $p < q$ を満たす)における1官能基によって環状構造が形成されているものとする。 R^1 は置換もしくは非置換アルカノイル、置換もしくは非置換アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換アラルキルオキシカルボニル、置換もしくは非置換アリールオキシカルボニル、置換もしくは非置換アロイル、9-フルオレニルメトキシカルボニル、または水素を表し、 X^1 は2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、スベリン酸、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリンまたは4-ヒドロキシプロリンの各残基を表し、 X^2 はロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、ノルバリン、ノルロイシン、2-アミノブタン酸、ホモロイシン、 β -アラニン、 α -アミノイソブタン酸、 β -シクロプロピルアラニン、 β -クロロアラニン、1-アミノシクロペンタン-1-カルボン酸、1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸、2-アミノ-1-シクロペンタンカルボン酸、t-ブチルグリシン、ジエチルグリシン、t-ブチルアラニン、0-メチルセリン、シクロヘキシルグリシン、シクロヘキシルアラニン、またはグリシンの各残基を表し、 X^3 はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、 X^4 はセリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジ

ン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸の各残基を表し、X⁵はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、X⁶はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンの各残基を表し、X⁷はアラニン、 β -アラニン、2-アミノ安息香酸、3-アミノ安息香酸、4-アミノ安息香酸、3-アミノメチル安息香酸、プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、L-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-7-カルボン酸、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、p-アミノフェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、またはグリシンの各残基を表し、X⁸はグルタミン、アスパラギン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸を表し、X⁹はセリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジ

ン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸の各残基を表し、X¹⁰はセリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸の各残基を表し、X¹¹はセリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸の各残基を表し、X¹²はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、X¹³はヒスチジン、アラニン、4-チアゾリルアラニン、2-チエニルアラニン、2-ピリジルアラニン、3-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、(3-N-メチル)ピペリジルアラニン、3-(2-キノイル)アラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン

、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンの各残基を表し、 X^{14} はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、またはグリシンの各残基を表し、ここで X^{14} の側鎖のアミノ基またはグアニジノ基は R^3 (R^3 は R^1 と同義である)で修飾されてもよく、 X^{15} はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンの各残基を表し、 X^{16} はロイシン、アラニン、4-チアゾリルアラニン、2-チエニルアラニン、イソロイシン、ノルロイシン、ホモロイシン、バリン、ノルバリン、 β -アラニン、 α -アミノイソブタン酸、2-アミノブタン酸、 β -シクロプロピルアラニン、 β -クロロアラニン、1-アミノシクロペンタン-1-カルボン酸、1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸、2-アミノ-1-シクロペンタンカルボン酸、*t*-ブチルグリシン、ジエチルグリシン、*t*-ブチルアラニン、0-メチルセリン、シクロヘキシルグリシン、シクロヘキシルアラニン、またはグリシンの各残基を表し、 X^{17} は 2-メルカプトアニリン、システアミン、ホモシステアミン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、オルニチン、リジン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、p-アミノフェニルアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、または 2-アミノスベリン酸の各残基を表し、 R^2 は置換もしくは非置換アルコキシ、置換もしくは非置換アラルキルオキシ、アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換アラルキルアミノ、置換もし

くは非置換アリールアミノ、またはヒドロキシを表す。さらに配列中の任意の位置において、同一または異なって上記 X^1 で表される有機酸、アミノ酸、または 12-アミノドデカン酸の残基から任意に選ばれる 1 もしくは数個の残基が欠失、置換または付加されていてもよい。} で表され、変異 P53蛋白質のDNA 結合活性を回復させるか、または、変異 P53蛋白質 のP53蛋白質 依存性の転写活性を回復させる環状構造を持つペプチドおよびその薬理的に許容される塩を提供する。

以下、式 (I) で表される化合物を化合物 (I) と呼ぶ。

式 (I) の R^1 および R^2 の定義において、アルカノイル、アルコキシ、アルコキシカルボニル、アルキルアミノ、およびジアルキルアミノにおけるアルキル部分としては炭素数 1~20 の直鎖または分岐状のアルキル、あるいは炭素数 3~8 の脂環式アルキルがあげられる。炭素数 1~20 の直鎖または分岐状のアルキルとしては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、ヘキサデシル、またはオクタデシルなどがあげられる。炭素数 3~8 の脂環式アルキルとしては、例えばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、またはシクロオクチルなどがあげられる。アリールオキシカルボニル、アロイル、またはアリールアミノのアリール部分としては、例えばフェニルまたはナフチルなどがあげられる。アラルキルオキシカルボニル、アラルキルオキシ、またはアラルキルアミノにおけるアラルキル部分としては炭素数 7~20 のベンジル、フェネチル、ベンズヒドリル、またはトリチルなどがあげられる。アルカノイル、アルコキシ、アルコキシカルボニル、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールオキシカルボニル、アロイル、アリールアミノ、アラルキルオキシカルボニル、アラルキルオキシ、およびアラルキルアミノにおける置換

基としては、同一または異なって置換数 1~3 のハロゲン、ニトロ、アルキル、アリール、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールオキシ、カルボキシ、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、または複素環基などがあげられる。該置換基においてハロゲンはフッ素、塩素、臭素、またはヨウ素の各原子を表し、アルキル、アルコキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、およびアルコキシカルボニルにおけるアルキル部分および、アリール、アリールオキシ、およびアリールオキシカルボニルにおけるアリール部分は前記と同義である。複素環基は、酸素、硫黄、窒素などのヘテロ原子を少なくとも 1 個以上含む 3~8 員環の脂環式複素環基、芳香族複素環基、およびそれらの縮合多環基もしくはそれらとアリールとの縮合多環基を含み、例えばイミダゾリル、ピリジル、インドリル、キノリル、イソキノリル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノ、ホモピペラジニルなどがあげられる。

配列中、1 もしくは数個の残基が欠失、置換、または付加されていてもよいとは、該配列中の任意に選ばれる単一もしくは複数個の部分における単一もしくは複数個の、上記のアミノ酸もしくは有機酸の残基の欠失、置換もしくは付加、または 12-アミノドデカン酸の残基の置換または付加において、それらの残基の欠失、置換、または付加の総数が 1 もしくは数個の残基であることを意味し、欠失、置換、または付加が同時に生じてもよい。配列中、1 もしくは数個の任意の残基が付加されてよいとは上記において付加のみが生じ得ることを意味する。また、前記の欠失、置換もしくは付加の個数は、1~10 個であるのが好ましく、さらには 1~4 個であるのがより好ましい。

化合物 (I) の薬理学的に許容される塩としては、酸付加塩、金属塩、有機塩基付加塩等があげられる。薬理学的に許容される酸付加塩としては、塩

酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩等の有機酸塩があげられ、薬理学的に許容される金属塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等があげられる。薬理学的に許容される有機塩基付加塩としては、メチルアミン、エチルアミン、アニリン等の一級アミン、ジメチルアミン、ジエチルアミン、ピロリジン、ピペリジン、モルホリン、ピペラジン等の二級アミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、N,N-ジメチルアニリン、ピリジン等の三級アミンとで形成される塩、アンモニウム塩等があげられる。

本発明において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関する IUPAC-IUB 委員会 (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature) の勧告〔ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry), 138 巻, 9 頁 (1984 年)〕に従った。

以下の略号は、特に断わらない限り対応する下記のアミノ酸または有機酸を表す。

Gly: グリシン

Thr: L-スレオニン

Gln: L-グルタミン

Glx: L-グルタミン酸または L-グルタミン

Leu: L-ロイシン

Ser: L-セリン

Lys: L-リジン

Arg: L-アルギニン

Asp: L-アスパラギン酸

His: L-ヒスチジン

Cys: L-システイン

Add: 12-アミノドデカン酸

次に本発明において好ましい環状構造を持つペプチドの具体例をあげる。

・本発明における環状構造を持つペプチドの中で好ましい例

- (1) 環状構造が X^p および X^q の間で $S-S$ 、 $S-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-C_6H_4-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-CO$ 、 $CO-NH$ 、 $NH-CO$ 、 $O-CO$ 、または $CO-O$ 結合によって形成されるペプチド。
- (2) X^p ($n_p = 1$) が、N末端残基であり、 X^q ($n_q = 1$) がC末端残基である上記(1)タイプのペプチド。
- (3) X^p ($n_p = 1$) がN末端残基以外の配列中の残基であり、 X^q ($n_q = 1$) がC末端残基以外の配列中の残基であるである上記(1)タイプのペプチド。
- (4) X^p ($n_p = 1$) がN末端残基以外の配列中の残基であり、 X^q ($n_q = 1$) がC末端残基である上記(1)タイプのペプチド。
- (5) X^p ($n_p = 1$) がN末端残基であり、 X^q ($n_q = 1$) がC末端残基以外の配列中の残基であるである上記(1)タイプのペプチド。
- (6) X^p ($n_p = 1$) が X^1 であり、 X^q ($n_q = 1$) が X^{17} である上記(2)タイプのペプチド。
- (7) X^p ($n_p = 1$) が X^1 であり、 X^q ($n_q = 1$) が X^{17} である上記(5)タイプのペプチド。
- (8) X^p ($n_p = 1$) が X^1 であり、 X^q ($n_q = 1$) が X^{16} である上記(5)タイプのペプチド。
- (9) X^p ($n_p = 1$) がN末端残基であり、 X^q ($n_q = 1$) が X^8 である上記(5)タイプのペプチド。
- (10) X^p ($n_p = 1$) が X^8 であり、 X^q ($n_q = 1$) が X^{14} である上記(3)タイプのペプチド。

(11) X^p ($n_p = 1$) が X^3 であり、 X^q ($n_q = 1$) が C 末端残基である
上記 (4) タイプのペプチド。

(12) X^p ($n_p = 1$) が X^3 であり、 X^q ($n_q = 1$) が C 末端残基以外で
ある上記 (3) タイプのペプチド。

(13) X^p ($n_p = 1$) が N 末端残基であり、 X^q ($n_q = 1$) が X^{11} であ
る上記 (5) タイプのペプチド。

中でも、(6) ~ (13) のタイプのペプチドがより好ましい。

次に、好ましい化合物 (I) をさらに具体的に第 1-1 表。第 1-2 表中
に例示し、また化合物 (I) に近縁の直鎖ペプチドを参考例として同表中に
示す。これらの中で化合物 4 ~ 8、11、17 ~ 24 が特に好ましい例であ
る。

第1-1表

化合物番号	構造
1	H-LKSKKGQSTSRHKKL-OH
2	H-KSKKGQSTSRHKK-OH
3	H-KKGQSTSRHKK-OH
4	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-OH
5	LKSKKGQSTSRHKKL
6	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH ₂
7	Ac-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH ₂
8	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH-(CH ₂) ₁₁ -CONH ₂
9	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH-(CH ₂) ₁₁ -CH ₃
10	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃
11	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH ₂ Ac
12	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH ₂ (CH ₂)
13	H-KLKSCKKGQSTSRHKKL
14	H-CLKSKKGCSTSRHKKL-NH ₂
15	H-KLKSCKKGDSTSRHKKL-NH ₂
16	H-LKSKKGDSTSRHKKL-NH ₂

アミノ酸残基は一文字標記で示す。略号との対応は以下の通りである。
 G; Gly, T; Thr, D; Asp, Q; Gln, L; Leu, S; Ser, K; Lys, R; Arg, H; His, C; Cys

第1-2表

化合物番号	構造
17	$\text{H-CLKSKKQSTSRHKKLC-NH}_2$
18	$\text{CH}_2\text{CO-LKSKKGQSTSRHKKLC-NH}_2$
19	$\text{H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH}_2$
20	$\text{H-LKCKKGQSTSRHKKLC-NH}_2$
21	$\text{H-CLKSKKGQSTCRHKKL-NH}_2$
22	$\text{H-LKCKKGQSTCRHKKL-NH}_2$
23	$\text{H-CLKSKKGQSTSRHKKLCG-NH-(CH}_2)_3\text{-CH}_3$
24	$\text{H-LKDKKGQSTSRHKKL-NH}_2$

アミノ酸残基は一文字標記で示す。

略号との対応は以下の通りである。

G ; Gly, D ; Asp, Q ; Gln, L ; Leu, T ; Thr,
S ; Ser, K ; Lys, R ; Arg, C ; Cys, H ; His

化合物1は配列番号1、化合物2は配列番号2、化合物3は配列番号3、
化合物4は配列番号4、化合物5は配列番号5、化合物6は配列番号6、化
合物7は配列番号7、化合物8は配列番号16、化合物9は配列番号17、
化合物10は配列番号18、化合物11は配列番号19、化合物12は配列
番号20、化合物13は配列番号21、化合物14は配列番号22、化合物
15は配列番号23、化合物16は配列番号24、化合物17は配列番号2
5、化合物18は配列番号26、化合物19は配列番号27、化合物20は
配列番号28、化合物21は配列番号29、化合物22は配列番号30、化

化合物 2 3 は配列番号 3 1、化合物 2 4 は配列番号 3 2 に対応する。

以下の略号は、対応する下記のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す。

Fmoc: 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル

t-Bu: t-ブチル

Trt: トリチル

Pmc: 2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル

Boc: t-ブチルオキシカルボニル

Mtt: 4-メチルトリチル

Aloc: アリルオキシカルボニル

Al: アリル

Fmoc-Thr(t-Bu)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-0-t-ブチル-L-スレオニン

Fmoc-Thr(Trt)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-0-トリチル-L-スレオニン

Fmoc-Ser(t-Bu)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-0-t-ブチル-L-セリン

Fmoc-Ser(Trt)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-0-トリチル-L-セリン

Fmoc-Lys(Boc)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^ε-t-ブチルオキシカルボニル-L-リジン

Fmoc-Gln(Trt)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^δ-トリチル-L-グルタミン

Fmoc-Arg(Pmc)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^ε-2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル-L-アルギニン

Fmoc-His(Trt)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N¹-トリチル

ル-L-ヒスチジン

Fmoc-Cys(Trt)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-S-トリチル-L-システイン

Fmoc-Lys(Mtt)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^ε-4-メチルトリチル-L-リジン

Boc-Cys(Trt)-OH: N^α-t-ブチルオキシカルボニル-S-トリチル-L-システイン

Fmoc-Lys(Aloc)-OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^ε-アリルオキシカルボニル-L-リジン

Fmoc-Asp(OAl)-OH: N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸-β-アリルエステル

以下の略号は、対応する下記の反応溶媒、反応試薬等を表す。

PyBOP: ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノフォスフォニウム・ヘキサフルオロフォスフェート

HBTU: 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスフェート

HATU: 0-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロフォスフェート

HOBt: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール

HONSu: N-ヒドロキシスクシンイミド

NMM: N-メチルモルホリン

DMF: N,N-ジメチルホルムアミド

DCM: ジクロロメタン

DMSO: ジメチルスルホキシド

NMP: N-メチルピロリドン

TFA: トリフルオロ酢酸

DIEA: ジイソプロピルエチルアミン

TFE: トリフルオロエタノール

次に、化合物（I）の製造法について説明する。

化合物（I）は、一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる〔ザ・ペプタイズ、アナリシス、シンセシス、バイオロジー、第 1 巻（The Peptides, Analysis Synthesis, Biology, vol. 1）、エアハルト・グロス（Erhard Gross）およびヨハン・マインホフアー（Johannes Meinhofer）編、アカデミック・プレス（Academic Press）、1979 年、第 2 巻 1980 年、第 3 巻 1981 年；ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善、1985 年；続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店、1991 年；インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプタイド・アンド・プロテイン・リサーチ（International Journal of Peptide Protein Research）、35 巻、161 頁（1990 年）〕。

また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、アプライド・バイオシステム社製（Applied Biosystems, Inc., USA、以後 ABI 社と略称する）ペプチド合成機、アドバンスド・ケムテック社製（Advanced ChemTech Inc., USA、以後 ACT 社と略称する）ペプチド合成機等の市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護した N^{α} -Fmoc-アミノ酸あるいは N^{α} -Boc-アミノ酸等を用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。

化合物（I）の原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI 社、島津製作所、国産化学（株）、ノバ・バイオケム社（Nova Biochem）、渡辺化学（株）、ACT 社、またはペプチド研究所（株）等から入手することができる。また、化合物（I）の原料となる保護アミノ酸、保護有機酸、保護有機アミンは報告されている合成法に従って、あるいはそれに準じて合成することができる〔ザ・ペプタイズ、アナリシス、シンセシス、バイオロジー、第 1

卷 (The Peptides, Analysis Synthesis, Biology, vol. 1)、エアハルト・グロス (Erhard Gross) およびヨハン・マインホフアー (Johannes Meinhofer) 編、アカデミック・プレス (Academic Press)、1979 年、第 2 巻 1980 年、第 3 巻 1981 年；ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善、1985 年；続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店、1991 年；インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプチド・アンド・プロテイン・リサーチ (International Journal of Peptide Protein Research)、35 巻、161 頁 (1990 年) 。

環化反応は必要なアミノ酸または有機酸を液相法または固相法等により縮合した後、またはその途中の段階で行われる。後者の場合は、得られた環状構造部分にさらにアミノ酸または有機酸を縮合させて化合物 (I) を完成させる。

また、環状構造を完成させる方法として：

(1) 一般式 (I) 中の X^p と X^q の間に架橋結合を形成させ、環状構造を完成させる。

(2) 環状構造の一部をなす隣接したアミノ酸または有機酸の間で $CO-NH$ 結合を形成させ、環状構造を完成させる。

といった方法をとることができる。

また、環化反応に際しては、副反応の抑制という点で環化反応にかかわらない他の官能基は、適当な保護基で保護されているのが、好ましい。

以下の説明において、有機化学反応における一般的精製方法とは、例えば、中和、濾過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、析出、再結晶、各種クロマトグラフィ等意味する。

(工程 1-1) S-S 結合による環状結合の形成法

適当な保護基により保護されたチオール基を 2 個有するペプチドを、固相法、液相法、またはそれらの組み合わせによって得た後に、チオール保護基

以外の保護基をまず除去し、続いて該チオール保護基を除去することによって得られる前駆体ペプチドを酸化反応に付し、有機化学反応における一般的精製方法を経て目的のS-S結合を含む環状構造を持つペプチドを製造することができる。

1-1-A

該前駆体ペプチドを反応に不活性な溶媒中空気酸化に付すか、酸化剤と反応させることによりS-S結合を持つ環状構造を持つペプチドを製造することができる。反応は、溶媒中、 $0.5\sim 5000\mu\text{mol/l}$ 、好ましくは $50\sim 500\mu\text{mol/l}$ のペプチド濃度で行う。溶媒はpH4~9、好ましくはpH6~8に調整した50mM~1Mのトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸（Tris-HCl）等の緩衝液、5~50%酢酸-水溶液、水、またはDMF、DMSO、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、メタノール、エタノール等の有機溶媒を単独もしくは混合して用いる。酸化剤としては該前駆体ペプチドに対する重量比0.1~1倍量のフェリシアン化カリウム、同重量比0.5~5倍量、好ましくは等重量のよう素、または10~50%濃度のDMSO等が用いられる。反応は通常0~40℃で、1時間~1週間で終了する。本酸化反応に際して、グルタチオンを加えると収率の向上が図られることがあり、該前駆体ペプチドに対して重量比0.5~5倍量の酸化型グルタチオンとその1/2量の還元型グルタチオンを共存させて反応させてもよい〔ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー（Journal of American Chemical Society）103巻、5867頁（1981年）；続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、239頁、矢島治明監修、廣川書店（1991年）〕。酸化剤としてよう素を用いる場合は反応終了後、亜鉛粉末を溶液からよう素の色が消えるまで加え、そのままで、あるいは減圧下に濃縮後、各種クロマトグラフィーによって精製する。酸化剤としてフェリシアン化カリウムを用いる場合は酢酸を加えて溶液を微酸性とした後、そのままで、あるいは減圧下に濃縮後、各種クロマトグラフィーによっ

て精製してもよく、また Dowex 1X2(AcO⁻) (ダウ・ケミカル社) 等の陰イオン交換樹脂を加えて過剰のフェリシアン化カリウム (フェリシアンイオン、フェロシアンイオン) を吸着除去した後にそのまま、あるいは減圧下に濃縮後、各種クロマトグラフィーによって精製してもよい。

また、所望の一個所のチオール基をビリジルスルフェニル化または 2-ニトロビリジルスルフェニル化しておき、もう一方のチオール基の保護基を選択的に除去させると同時に一気に環化反応を進行させることもできる [インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプチド・アンド・プロテイン・リサーチ (International Journal of Peptide and Protein Research) 29 巻、162 頁 (1987 年) 参照]。環化反応に用いられる溶媒、反応温度、および反応時間等は概ね上記と同様である。さらに 2 個所のチオール基の保護基を除去した後、ビリジルスルフェニル化試薬または 2-ニトロビリジルスルフェニル化試薬を 1 当量分導入してもよい。また、ビリジルスルフェニル化反応には例えば 2,2'-ジチオジビリジンを用い、1~3 当量をペプチドを含む溶媒に加えて攪拌すればよい。2-ニトロビリジルスルフェニル化もこれに準じて行うことができる。反応に用いられる溶媒、反応温度、および反応時間等は概ね上記と同様である [ペプチド・ケミストリー (Peptide Chemistry) 1991 巻、125 頁 (1992 年)]。

1-1-B

適当な保護基により保護されたチオール基を 2 個有するペプチドを、固相法によって伸長し、樹脂よりペプチドを切り出す前に、チオール保護基を選択的に除去し、酸化反応に付すことによって環状構造を持つペプチドを製造することができる。その後樹脂よりペプチドを切り出しさらに残る保護基を除去すれば、目的の環状構造を持つペプチドが得られる。

上記のチオール保護基としては、例えば、アセトアミドメチル (Acm) 基またはトリチル基 (Trt) を好ましく用いることができる。樹脂上の保護ペプチ

ドを例えば DMF、DCM などの適当な溶媒中、よう素を反応させると Ac_m 基や Trt 基が除去されると同時に分子内ジスルフィド結合が形成される。樹脂 50 mg に対し、0.5～2 ml の溶媒を用い、樹脂上の該ペプチドの計算重量に対する重量比 0.5～5 倍量、好ましくは等重量のよう素と反応させる。反応は通常 0～40 °Cで行い、1 時間～1 週間で終了する。反応終了後は、固相法の通常の処理、即ち、少量の DMF、DCM 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いることができる。

また、上記 1-A で述べた一個所の SH 基をピリジルスルフェニル化または 2-ニトロピリジルスルフェニル化する方法を固相法で行うこともでき、環化反応に用いられる溶媒、反応温度、および反応時間等は概ね上記と同様である。さらに液相法と同様に二個所の SH 基をフリー化した後、ピリジルスルフェニル化試薬または 2-ニトロピリジルスルフェニル化試薬を 1 当量分導入してもよい。反応には例えば 2,2'-ジチオジピリジンを用い、1～3 当量を溶媒により膨潤させた樹脂に加えて攪拌すればよい。2-ニトロピリジルスルフェニル化も同様である。反応に用いられる溶媒、反応温度、および反応時間等は概ね上記固相反応における環化反応と同様である。

(工程 1-2) S-CH₂-S 結合による環状結合の形成法

S-ジメチルフォスフィノチオニル基を導入したチオール基を 2 個有するペプチドを、固相法、液相法、またはそれらの組み合わせによって製造する。次いで塩化メチレンおよびテトラブチルアンモニウムフルオリド存在下に該ペプチドを反応させ、有機化学反応における一般的精製方法を経て目的の環状構造を持つペプチドを製造することができる〔ペプチド・ケミストリー (Peptide Chemistry) 1995、西則雄編、蛋白質研究奨励会 (Protein Research Foundation, Osaka)、41 頁 (1996 年)〕。

1-2-A

溶媒は反応に不活性なものであれば使用可能であるが、中でも塩化メチレ

ンまたは塩化メチレンを含む混合溶媒が好ましく用いられる。前記の溶媒としてはアセトニトリル、テトラヒドロフラン、クロロホルム、DMF 等があげられる。反応液中のペプチドの濃度は、 $0.5 \sim 5000 \mu\text{mol/l}$ 、好ましくは $50 \sim 500 \mu\text{mol/l}$ である。テトラブチルアンモニウムフルオリドは 2～10 当量、好ましくは 2～3 当量を用いる。反応は通常 $0 \sim 40^\circ\text{C}$ で、1 時間～1 週間で終了する。反応終了後、ジエチルエーテル等を加えてペプチドを沈殿させ、さらに溶媒を除き、その後、必要に応じて各種クロマトグラフィーで精製し、次の反応に用いてもよい。必要に応じて、前記のような有機化学反応における一般的な精製方法を用いてもよい。

1-2-B

S-ジメチルフォスフィノチオニル基を導入したチオール基を 2 個有するペプチドを、固相法によって合成する。さらに、樹脂よりペプチドを切り出す前に塩化メチレンおよびテトラブチルアンモニウムフルオリド存在下に該ペプチドを反応させることによって環状構造を持つペプチドを製造することができる。その後樹脂よりペプチドを切り出しさらに残る保護基を除去すれば、目的の環状構造を持つペプチドが製造される。

樹脂上の保護ペプチドを例えば DCM 単独 または DCM/DMF の混合溶媒中、テトラブチルアンモニウムフルオリドで処理することにより目的の環状構造が形成される。樹脂 50 mg に対し、 $0.5 \sim 2 \text{ ml}$ の溶媒を用い、樹脂上の該ペプチドの計算モル数に対し 2～20 当量のテトラブチルアンモニウムフルオリドで処理する。反応は通常 $0 \sim 40^\circ\text{C}$ で行い、1 時間～1 週間で終了する。反応終了後は、通常の固相法の処理に用いられる方法、例えば、少量の DMF、DCM 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いてもよい。

(工程 1-3) $\text{S}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{S}$ 結合による環状結合の形成法

S-ベンジル基を導入したチオール基を 2 個有するペプチドを、固相法、

液相法、またはそれらの組み合わせによって製造する。次いでジブロモキシレン存在下に液体アンモニア中金属ナトリウムと該ペプチドを反応させ、有機化学反応における一般的精製方法を経て目的の環状構造を持つペプチドを製造することができる〔インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプチド・アンド・プロテイン・リサーチ(International Journal of Peptide and Protein Research) 40 巻、233 頁(1992 年)〕。また、遊離チオール基を有するアミノ酸残基もしくは有機基を配列中の 2 個所に有するペプチドを、固相法、液相法、またはそれらの組み合わせによって製造し、ジブロモキシレンと反応させることによって、目的の環状構造を持つペプチドを製造することができる。また、架橋部分の $-C_6H_4-$ (フェニレン) は、例えば、*o*-フェニレン、*m*-フェニレンまたは *p*-フェニレンである。

本手法において、ジブロモキシレンの代わりに、ジブロモアルカンを用いれば、 $-S-(CH_2)_n-S-$ 結合による環状結合を形成することもできる。

1-3-A

S-ベンジル基を導入したチオール基を 2 個有するペプチドを用いる場合、該ペプチドを乾燥液体アンモニアに溶解し、青色の呈色が数分持続するまで金属ナトリウムを加える。ここにジブロモキシレンを加え反応させる。反応液中のペプチドの濃度は $0.5 \sim 5000 \mu\text{mol/l}$ 、好ましくは $50 \sim 500 \mu\text{mol/l}$ で反応を行う。ジブロモキシレンは 1~3 当量、好ましくは 1~1.5 当量を用いる。反応は通常 液体アンモニアを還流させた状態で、1~24 時間で終了する。反応終了後、アンモニアを除き、残さに水を加え、必要に応じ各種クロマトグラフィーで精製する。必要に応じこうした操作を含む有機化学反応における一般的精製方法を用いてもよい。

遊離チオール基を 2 個有するペプチドを用いる場合は、5~50%、好ましくは 10~20%のメタノールと 0.1%の TFA あるいは 1%の酢酸を含む水に溶解した後ジブロモキシレンを加え、希アンモニア水で pH を 5~8、好ましくは 6.5~7.5 に調整して反応させる。ジブロモキシレンは 1~3 当量、好ま

しくは1~1.5当量を用いる。反応は通常0~40℃で1時間~1週間で終了する。反応終了後、反応液をそのまま、あるいは減圧下に濃縮後、各種クロマトグラフィーで精製する。必要に応じて、前記のような有機化学反応における一般的精製方法を用いてもよい。

1-3-B

適当な保護基により保護されたチオール基を2個有するペプチドを、固相法によって伸長し、樹脂よりペプチドを切り出す前にチオール保護基を選択的に除去し、DMF、NMPなどの溶媒中ジブロモキシレンと反応させることによって、環状構造を持つペプチドを製造することができる。その後樹脂よりペプチドを切り出し、さらに残る保護基を除去すれば、目的の環状構造を持つペプチドが製造される。

樹脂上の保護ペプチドをDMF、NMP等の適当な溶媒中、ジブロモキシレンと反応させることにより環状構造部分が形成される。樹脂50mgに対し、0.5~2mlの溶媒を用い、樹脂上の該ペプチドの計算モル数に対し1~3当量のジブロモキシレンを反応させる。反応液に1~10当量、好ましくは2~5当量のNMMなどの塩基を加えてもよい。反応は通常0~40℃で行い、1時間~1週間で終了する。反応終了後は、固相法の通常の処理、即ち、少量のDMF、DCM等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いてもよい。

(工程1-4) S-CH₂CO-結合による環状結合の形成法

無保護のチオール基およびプロモアセチル基を各1個有するペプチドを、固相法、液相法、またはそれらの組み合わせによって製造する。プロモアセチル化は、通常のペプチド鎖中のアミノ基をアセチル化する方法に準じておこなうことができる。次いで該ペプチドを水に溶解し、pHを弱アルカリ性に調整することで環化反応を行い、有機化学反応における一般的精製方法を経て目的の環状構造を持つペプチドを製造することができる〔ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (Journal of Medicinal Chemistry) 35巻、2040頁(1992年)〕。

1-4-A

無保護のチオール基およびブロモアセチル基を各 1 個有するペプチドを水に溶解し、希アンモニア水で pH を 6~8、好ましくは 6.5~7.5 に調整し、環化反応をおこなう。ペプチドの濃度は 0.5~5000 $\mu\text{mol/l}$ 、好ましくは 50~500 $\mu\text{mol/l}$ で反応を行なう。反応は通常 0~40°C で、1 時間~1 週間で終了する。反応終了後、反応液に酢酸などを加えて弱酸性にした後、そのままで、あるいは減圧下に濃縮後、各種クロマトグラフィーで精製する。必要に、応じて前記のような有機化学反応における一般的精製方法を用いてもよい。

1-4-B

適当な保護基により保護されたチオール基およびブロモアセチル基を各 1 個有するペプチドを、固相法によって伸長し、樹脂よりペプチドを切り出す前にチオール保護基を選択的に除去し、DMF、NMP などの溶媒中、NMM などの有機塩基を適量加え、環化反応をおこなうことによって、目的の環状構造を持つペプチドを製造することができる。その後、樹脂よりペプチドを切り出しさらに残る保護基を除去すれば、目的の環状構造を持つペプチドが製造される。

樹脂上の保護ペプチドを例えば DMF、NMP 等の適当な溶媒中、NMM などの塩基を加え環化反応をおこなうことにより目的の環状構造が形成される。樹脂 50 mg に対し、0.5~2 ml の溶媒を用い、樹脂上の該ペプチドの計算モル数に対し 1~10 当量、好ましくは 2~5 当量の NMM を加え攪拌する。反応は通常 0~40 °C で行い、1 時間~1 週間で終了する。反応終了後は、固相法の通常の処理、即ち、少量の DMF、DCM 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いてもよい。

(工程 2) CO-NH または NH-CO 結合による環状結合の形成法

適当な保護基により保護されたアミノ基および適当な保護基により保護されたカルボキシル基を各 1 個有するペプチドを、固相法、液相法、またはそれらの組み合わせによって製造する。さらに、該アミノ基および該カルボキシル基の保護基を選択的に除去した後に得られるペプチドを分子内縮合反応

に付し、有機化学反応における一般的精製方法を経て、環状構造を持つペプチドを得、さらに残る保護基の脱保護反応を行うことにより目的のペプチドを製造することができる。また、環状構造を持つペプチド部分を得た後にペプチド鎖を伸長して目的のペプチドへと導いてもよい。

また、環状構造を完成させる方法として：

(1) 一般式 (I) 中の X^p と X^q の間に架橋結合を形成させ、環状構造を完成させる。

(2) 環状構造の一部をなす隣接したアミノ酸または有機酸の間で $CO-NH$ 結合を形成させ、環状構造を完成させる。

といった方法をとることができる。

2-A

アミノ基の保護基として 4-メチルトリチル基を用いる場合、該脱保護反応は酢酸／トリフルオロエタノール／DCM (1/2/7) を用いて行うことができる。反応は 通常 $0\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ で行い、 $0.5\sim 6$ 時間で終了する。反応終了後、ジエチルエーテル等を加えてペプチドを沈殿させ、溶媒を除くか、減圧下に溶媒を除く。必要に応じて、前記のような操作を含む有機化学反応における一般的な精製方法を用いてもよい。

アミノ基の保護基としてアリルオキシカルボニル基を用い、カルボキシ基の保護基としてアリルエステル基を用いる場合、パラジウム触媒の存在下、還元させれば、所望の脱保護反応を進行させることができる。パラジウム触媒は 0 価の均一系触媒であればいずれでもよく、テトラキス(トリフェニルフォスフィン)パラジウム(0)、または酢酸パラジウム(II)ートリフェニルフォスフィン等が例示される。添加量は上記保護基に対して $0.01\sim 1$ 当量、好ましくは $0.1\sim 0.5$ 当量を用いる。さらに添加剤として上記保護基に対して 1 当量から過剰量のギ酸、ギ酸ートリエチルアンモニウム、水素化トリブチルスズ、水素化トリフェニルスズ、トリメチルヒドロシラン、水素化

ホウ素ナトリウム、酢酸、酢酸-NMM 等を加える。溶媒としては、エーテル、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、DMF、クロロホルム等を単独もしくは混合して用いてもよい。アリルオキシカルボニル基またはアリルエステル基 1 mM に対し上記の還元剤（パラジウム触媒と添加剤）と溶媒 3~10 ml を加え、反応は -20~80 °C、好ましくは 0~30 °Cで行い、10 分~6 時間で終了する。反応終了後、有機化学反応における一般的精製方法を用いてもよい。

また、カルボキシル基のみをアリルエステル基により保護してもよく、その場合も上記の操作と同様の処理を行う。

得られたペプチドのアミノ基とカルボキシル基の間で分子間アミド結合を次に形成する。環状化のためのアミド化反応の代表的なものを以下にあげる。各反応に共通な条件として、反応溶媒は DMF、NMP、塩化メチレン、クロロホルム、アセトニトリル、テトラヒドロフラン等を単独もしくは混合して用いる。ペプチドの濃度は 0.5~5000 $\mu\text{mol/l}$ 、好ましくは 50~500 $\mu\text{mol/l}$ で行う。反応は通常 0~40 °C、好ましくは 4~25 °Cで攪拌し、通常 3 時間から 1 週間で終了する。反応終了後、有機化学反応における一般的精製方法を用いてもよい。

カルボキシル基に対して 1~10 当量のジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) または水溶性カルボジイミド (WSC) 等のカルボジイミドを用いてもよい。さらにカルボジイミドの 1.5~2 当量の NMM、DIEA、または炭酸水素ナトリウムを加える。必要に応じカルボジイミドに対し添加剤として等モル量の HOBt または HONSu を加えてもよい。

カルボキシル基に対して 1~10 当量のジフェニルホスホリルアジド (DPPA) またはジエチルホスホロシアニデート (DEPC) 等の縮合剤を用いることもできる。さらに、前記の縮合剤の 1.5~2 当量の NMM、DIEA、または炭酸水素ナトリウムを加える。

カルボキシル基に対して 1~10 当量、好ましくは 2~5 当量のPyBOP、HBTU またはHATU等の縮合剤および前記の縮合剤と等モルのHOBtを用いることもできる。また、HATUは、HOBtを添加せずに単独で用いてもよい。さらに、前記の縮合剤の1.5~2当量のNMM、DIEA、または炭酸水素ナトリウムを加える。

また、カルボキシル基を活性化エステルへと導いた後、所望のアミノ基の保護基を選択的に脱離し、続いてアミド結合を形成してもよい。活性化エステルとしては p-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、N-オキシコハク酸イミドエステル等があげられる。活性化エステルの導入の方法は、通常の方法、例えば、DCC をカルボキシル基に対して 1~10 当量用い、等モルの p-ニトロフェノール、ペンタフルオロフェノール、または HONSu を加えて 0~5 °Cで 1 時間~1 日攪拌して反応させる。本活性エステル形成反応に用いられる溶媒、反応温度、反応時間等の反応条件は上記のアミド形成反応のものと同様である。

2-B

適当な保護基により保護されたアミノ基を有するアミノ酸残基および適当な保護基により保護されたカルボキシル基を各 1 個有するペプチドを固相法によって合成する。さらに、樹脂よりペプチドを切り出す前に、該アミノ基および該カルボキシル基の保護基を選択的に除去することによって得られるように生成するアミノ基およびカルボキシル基を縮合反応に付し、環状構造を持つペプチド部分を形成することができる。その後、樹脂よりペプチドを切り出すと同時に他のアミノ酸残基の側鎖保護基を除去すれば、目的の環状構造を持つペプチドが製造される。

アミノ基の保護基として 4-メチルトリチル基を用いる場合、該脱保護反応には樹脂 50 mg に対し、酢酸／トリフルオロエタノール／DCM (1/2/7) を 0.5 ~2 ml の割合で用いてもよい。反応は 通常 0~40 °Cで行い、0.5~6 時間で終了する。反応終了後は、通常の固相法に用いられる処理方法、例えば、

少量の DMF 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いてもよい。

アミノ基の保護基としてアリルオキシカルボニル基を用い、カルボキシル基の保護基としてアリルエステル基を用いる場合、脱保護反応には通常 0.1 ~0.2 M のテトラキス（トリフェニルフォスフィン）パラジウム(0)、5 % 酢酸、2.5 % NMMを含むクロロホルム等の溶液を用いてもよい。アリルオキシカルボニル基およびアリルエステル基 1 mM に対し上記クロロホルム溶液を 3 ~10 ml 加え、反応は通常 0~40 °Cで行い 0.5~6 時間で終了する。反応終了後は、通常の固相法に用いられる処理方法、例えば、少量の DMF 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いてもよい。

次に樹脂上の計算上のカルボキシル基量に対して 1~10 当量、好ましくは 2~5 当量の PyBOPもしくはHBTU等の縮合剤、または必要に応じて、前記縮合剤と等モルの HOBt、および前記の縮合剤の1.5~2当量のNMMまたはDIEAを含む DMF、DCM、または NMP などの有機溶媒の溶液を樹脂 50 mg に対し 1ml の割合で用いる。反応は通常 0~40 °C、好ましくは 4~25 °Cで攪拌し、通常 3 時間から 1 週間で終了する。反応終了後は、通常の固相法に用いられる処理方法、例えば、少量の DMF 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いてもよい。

（工程3）CO-OまたはO-CO結合による環状結合の形成法

適当な保護基により保護されたヒドロキシ基を適当な保護基により保護されたカルボキシル基を各1個有するペプチドを、固相法、液相法、またはそれらの組み合わせによって製造する。その後、該ヒドロキシ基および該カルボキシル基の保護基を選択的に除去することによって得られるペプチドを縮合反応に付し、有機化学反応における一般的精製方法を経て、環状構造を持つペプチドを得る。さらに、残る保護基の脱保護反応を行うことにより目的のペプチドを製造することができる。また、環状構造を持つペプチド部分構造を得た後に、ペプチド鎖を伸長して目的のペプチドへと導いてもよい。

3-A

ヒドロキシ基の保護基としてトリチル基を用いる場合、脱保護反応には TFA/TFE/DCM (5/5/90~1/5/94) を用いてもよい。反応は通常 0~40 °Cで行い、0.5~12 時間で終了する。反応後、有機化学反応における一般的精製方法を用いてもよい。またヒドロキシ基の選択的保護基として p-メトキシベンジル基または 2,4-ジメトキシベンジル基を用いることもでき、脱保護反応には保護されたヒドロキシ基の 1~10 当量の 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノンまたはセリック・アンモニウム・ナイトレートを用いる。反応溶媒は含水のDMF、NMP、塩化メチレン、クロロホルム、アセトニトリル、テトラヒドロフラン等を単独もしくは混合して用いる。反応は通常 0~40 °Cで行い、0.5~12 時間で終了する。反応後、有機化学反応における一般的精製方法を用いてもよい。

所望のカルボキシル基の選択的保護、脱保護は工程 2 における 2-A に準じて行うことができる。

得られたペプチドのヒドロキシ基とカルボキシル基の間で分子内エステル結合を次に形成する。環状化のためのエステル化反応の代表的なものを以下にあげる。各反応に共通な条件として、反応溶媒は DMF、NMP、塩化メチレン、クロロホルム、アセトニトリル、テトラヒドロフラン等を単独もしくは混合して用いる。ペプチドの濃度は 0.5~5000 $\mu\text{mol/l}$ 、好ましくは 50~500 $\mu\text{mol/l}$ で行う。反応は通常 -20~40 °C、好ましくは -20~30 °Cで攪拌し、通常 3 時間から 1 週間で終了する。反応終了後、有機化学反応における一般的精製方法を用いてもよい。

(1) 側鎖にヒドロキシ基を有するペプチドの溶液に対し、1~10 当量の DCC を加え、-20~40 °C、好ましくは -20~20 °Cで攪拌しエステル化反応を行う。ピリジンを経済として使用するか、または溶媒中に 10~100 % 共存さ

せるのが好ましい。

(2) カルボキシル基に対し 1~5 当量の 1-(2-メシチレンスルホニル)-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール (MSNT) を加え、0.5~1.5 当量の N-メチルイミダゾールを加えて攪拌し、エステル化反応を行う〔テトラヘドロン・レターズ (Tetrahedron Letters), 1701 頁 (1990 年)]。

(3) カルボキシル基に対して 1~10 当量、好ましくは 2~5 当量の DEPC を加えて、エステル化反応を行う〔テトラヘドロン・レターズ (Tetrahedron Letters), 1595 頁 (1973 年)]。

3-B

適当な保護基により保護されたヒドロキシ基および適当な保護基により保護されたカルボキシル基を各 1 個有するペプチドを固相法によって合成する。さらに、樹脂よりペプチドを切り出す前に、該ヒドロキシ基および該カルボキシル基の保護基を選択的に除去することによって生成するヒドロキシ基およびカルボキシル基を縮合反応に付し目的の環状エステル部分を形成することができる。その後、樹脂よりペプチドを切り出すと同時に残りの保護基を除去すれば、目的の環状構造を持つペプチドが製造される。

ヒドロキシ基の保護基としてトリチル基を用いる場合、該脱保護反応には樹脂 50 mg に対し、TFA/TFE/DCM (5/5/90~1/5/94) を 0.5~2 ml の割合で用いてもよい。反応は通常 0~40 °Cで行い、0.5~12 時間で終了する。ヒドロキシ基の保護基として p-メトキシベンジル基または 2,4-ジメトキシベンジル基を用いることもでき、脱保護反応にはヒドロキシ基の保護基に対して 1~10 当量の 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノンまたはセリック・アンモニウム・ナイトレートを用いる。含水の DMF、DCM、または NMP などの有機溶媒を樹脂 50 mg に対し 0.5~1 ml の割合で用いる。反応は通常 0~40 °C、好ましくは 0~25 °Cで行い、通常 0.5~12 時間で終了する。反応終了後は、固相法の通常の処理、即ち、少量の DMF 等の溶媒で樹脂を洗浄し

、次の反応に用いてもよい。

所望のカルボキシル基の選択的保護、脱保護は工程 2 における 2-B に準じて行うことができる。

次に樹脂上の計算量のカルボキシル基量に対して 1~10 当量、好ましくは 2~5 当量の MSNT、または DEPC 等の縮合剤を含む DMF もしくは NMP を樹脂 50 mg に対し 0.5~2 ml の割合で用いる。反応は通常 -20~40 °C、好ましくは -20~20 °C で攪拌し、通常 3 時間から 1 週間で終了する。反応終了後は、通常の固相法に用いられる処理方法、例えば、少量の DMF 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いてもよい。

このようにして得られた化合物 (I) は最終的に C-4、C-8、または C-18 等の各種逆相シリカゲルカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLC と略称する)、または分配、吸着樹脂、シリカゲル、化学修飾シリカゲル、逆相シリカゲル、アルミナ、珪藻土、珪酸マグネシウム、イオン交換樹脂等を用いた各種カラムクロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィー、さらには各種セファロース、セファデックスを用いたゲル濾過等により精製することができる。

化合物 (I) の薬理上許容される塩を取得するときは常法に従う。すなわち、化合物 (I) の酸付加塩および有機塩基付加塩は、対応する酸あるいは有機塩基の水溶液に化合物 (I) をいったん溶解した上で凍結乾燥するか上記の適当な分離精製手段で精製することによって製造される。また、化合物 (I) の金属塩は、対応する金属イオンを含む水溶液に化合物 (I) を溶解し、同様に上記の適当な方法で精製することによって得られる。

次に化合物 (I) の代表的な例における薬理活性について試験例を示す。

試験例 1 精製 P53 蛋白質を用いた変異 P53 の DNA 結合回復活性の測定
野生型および変異型 P53 発現組み換えバキュロウイルスの作製

変異 P53 の DNA 結合活性を測定するために、以下の方法で野生型および

2 種の変異型ヒト P53 蛋白質をバキュロウイルスを用いて昆虫細胞内に発現させた。昆虫細胞による蛋白質の生産には目的遺伝子を組み込んだ組み換えウイルスの作製が必要である。その作製は、目的蛋白質をコードする cDNA を特殊なプラスミドに組み込みトランスファーベクターを作製する過程と、野生型ウイルスとトランスファーベクターを昆虫細胞にコトランスフェクションし相同組み換えにより組み換えウイルスを取得する過程を経る。以上の過程についてファーマーミンジェン (Pharmingen) 社製バキュロゴールドスターキット (製品番号 PM-21001K) を用いてそのマニュアルに従い以下の手順で行った。

ヒト野生型および 2 種の変異型 (Arg273→His および Arg248→Trp) p53 cDNA をそれぞれ含むプラスミド WT393、273His、248Trp [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proceedings of the National Academy of Science USA), 89 巻, 5403 頁 (1992 年)] より p53 翻訳領域全長を含む NcoI-XbaI 断片 (1.6 kb) を調製し、末端に XbaI、NcoI 切断部位を有する以下の DNA 配列 (配列 8、9) を介して、バキュロウイルス発現ベクター pVL1393 (ファーマーミンジェン社製) の XbaI 部位に挿入することで、トランスファーベクター pBP53WT、pBP53M7、pBP53M6 をそれぞれ造成した。ここで用いた Arg273→His および Arg248→Trp の変異は共にヒト癌で多く見られる P53 の変異である。以下、それぞれ 2 種類の変異蛋白質を P53His273、P53Trp248 と略称する。

(配列 8、9)

5'-CTAGACAGCCAGACTGCCTTCCGGGTCCTGC-3'

3'-TGTCGGTCTGACGGAAGGCCAGTGACGGTAC-5'

続く組み換えウイルスの作製は TMN-FH インセクトメディウム (ファーマーミンジェン社製、以後 TMN-FH 培地と略称する) にて培養した昆虫細胞 Sf9 (ファーマーミンジェン社より購入、以後 Sf9 細胞と略称する) に線状バキュロウ

ィルス DNA〔バキュロゴールド・バキュロウィルス DNA (BaculoGold baculovirus DNA)、ファーミンジェン社製〕および作製したトランスファールベクター DNA をリポフェクチン法にて導入すること〔蛋白質核酸酵素、37 巻、2701 頁 (1992 年)〕により行い組み換えバキュロウィルスを以下のよう
に作製した。

トランスファールベクター pBP53WT、pBP53M7 または pBP53M6 をそれぞれ 1 μ g と線状バキュロウィルス DNA の 20 ng とを 12 μ l の蒸留水に溶解し、さらにリポフェクチン 6 μ l と蒸留水 6 μ l とを混和したものを加え室温で 15 分間放置した。一方 Sf9 細胞 2×10^6 個を 2 ml の Sf900-II インセクトメディウム〔ギブコ (Gibco) 社製、以後 Sf900-II 培地 と略称する〕に懸濁し、直径 35 mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れた。ここに上記のプラスミド DNA、線状バキュロウィルス DNA およびリポフェクチン混和溶液全量を加え 27 $^{\circ}$ C で 3 日間培養後、組み換えウィルスを含む培養上清 1 ml を採取した。シャーレには新たに Sf900-II 培地 1 ml を加え、さらに 27 $^{\circ}$ C で 3 日間培養し組み換えウィルスを含む培養上清をさらに 1.5 ml 得た。

次に蛋白発現に用いるために得られた組み換えウィルスを以下の手順で増殖させた。

Sf9 細胞 2×10^7 個を 10 ml の Sf900-II 培地に懸濁し、175 cm^2 フラスコ (グライナー社製) に入れて室温で 1 時間放置して細胞をフラスコに付着させた。放置後上清を除き新たに 15 ml の TMN-FH 培地と上記の組み換えウィルスを含む培養上清のうち 1 ml を加え 27 $^{\circ}$ C で 3 日間培養した。培養後上清を 1,500 \times g で 10 分間遠心分離して細胞を除き、蛋白発現に使用する組み換えウィルス溶液を得た。

得られた組み換えウィルス溶液についてウィルスの力価を以下の方法で算定した (ファーミンジェン社製バキュロゴールドスターターキットマニュアル

ル)。Sf9 細胞 6×10^6 個を 4 ml の Sf900-II 培地に懸濁し、直径 60 mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で 1 時間放置して細胞をシャーレに付着させた。次に上清を除き新たに Sf900-II 培地 400 μ l と Sf900-II 培地で 10,000 倍に希釈した上記組み換えウィルス溶液を加え室温で 1 時間放置した後、培地を除き 5 ml の 1 % 低融点アガロース〔アガーブランク・アガロース (Agarplaque Agarose)、ファーマンジェン社製〕を含む培地 (滅菌した 1 ml の 5 % アガーブランク・アガロース水溶液と 4 ml の TMN-FH 培地を混和し、42 °C に保温したもの) を該シャーレに流し込んだ。室温で 15 分間放置した後、乾燥を防ぐためビニルテープをシャーレにまき、プラスチック製容器に該シャーレを入れ、該容器を密閉した後、27 °C で 6 日間培養した。該シャーレに 0.01 % ニュートラルレッドを含むりん酸バッファー化生理食塩水 (phosphate buffered saline: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 、以後 PBS 緩衝液と略称する) 1 ml を加えさらに 1 日培養した後、出現したブランクの数を数えた。以上の操作より該組み換えウィルス溶液はいずれも約 1×10^8 ブランクフォーミングユニット (以後、pfu/ml と表す) のウィルスを含んでいることがわかった。

昆虫細胞による野生型および変異型 P53 の発現

ファーマンジェン社製バキュロゴールドスターターキットに添付されているマニュアルに従い以下の手順により野生型 P53 および変異型 P53His273、P53Trp248 蛋白質の発現を行った。野生型 P53、変異型 P53His273、および P53Trp248 蛋白質の培養液からの回収はヘパリンーセファロース (いずれもファルマシア・バイオテック社製) を用いて、ダニエルズ (D. A. Daniels) らの方法〔ジャーナル・オブ・モレキュラーバイオロジー (Journal of Molecular Biology), 243 巻, 639 頁 (1994 年)〕を改変した方法で行った。

野生型および変異型 P53 蛋白質は以下のようにして得た。あらかじめ 27 °C で培養しておいた Sf9 細胞 4×10^7 個を 175 cm^2 フラスコ (グライナー

社製) 中で Sf900-II 培地 30 ml に懸濁し、27 °Cで 30 分間放置した。培養上清を除き、新たに 10 ml の Sf900-II 培地と上で得られたトランスファクター pBP53WT、pBP53M7、または pBP53M6 由来の組み換えウィルスを約 1×10^8 pfu/ml の濃度で含む溶液を 2 ml 加えた。室温で 1~2 時間ゆっくり振盪し、新たに 20 ml の TMN-FH 培地を加え、さらに 27 °Cで 3~4 日間培養した。培養終了後、強く振盪することにより細胞を回収し、 $1,500 \times g$ で 10 分間遠心分離を行い沈殿を得た。この沈殿を 5 ml の PBS 緩衝液で 2 回洗浄し、沈殿として内部に野生型あるいは変異型 P53 蛋白質を発現している細胞を回収した。

上で取得した野生型あるいは変異型 P53 発現細胞 3.6×10^8 個を 10 ml の緩衝液〔10 mM トリスー塩酸 (pH 7.5)、10 mM KCl、2 mM $MgCl_2$ 、1 mM ジチオスレイトール (以後 DTT と略称する)、0.5 mg/ml エチレンジアミン四酢酸 (以後 EDTA と略称する)、1 mg/ml ベンザミジン (benzamidine)、 $10 \mu g/ml$ ロイペプチン、 $10 \mu g/ml$ アンチパイン、以後、本緩衝液を G 緩衝液という〕に懸濁し、50 ml 遠心管 (ファルコン社製 2070) 中で 0.5 M ショ糖を含む 10 ml の G 緩衝液の上に重層した。 $1,500 \times g$ 、10 分、4 °Cで遠心し、沈殿を再び 5 ml の G 緩衝液に懸濁した。懸濁液をテフロンホモジナイザー (岩城硝子社製) に移し、ベッセルを 30 回上下することにより細胞を破碎した。破碎液 5 ml を再び 50 ml 遠心管内で 0.5 M ショ糖を含む 5 ml の G 緩衝液の上に重層し、 $1,500 \times g$ 、10 分、4 °Cで遠心して、沈殿を核画分として回収した。この核画分を 5 ml の溶解緩衝液〔150 mM NaCl、50 mM トリスー塩酸 (pH 8.0)、5 mM EDTA、1 % ノニデット P-40 (以後、NP-40 と略称する)、1 mM ベンザミジン、以後、本緩衝液を溶解緩衝液 1 という〕に懸濁し、0 °C、40 分放置後、 $12,000 \times g$ 、30 分、4 °Cで遠心し、上清を取得した。上清を緩衝液〔20 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸 (以後 HEPES と略称する)-KOH (pH 8.0)、0.1 mM EDTA、0.1 %

トリトン(Triton) X 100、5 mM DTT、1 mM ベンザミジン、15 % グリセロール、以後、本緩衝液を A 緩衝液という〕で 4 倍容に希釈し、あらかじめ、A 緩衝液で平衡化した Hi-TrapTM ヘパリンセファローズ (Heparin-Sepharose) カラム (5 ml、ファルマシアバイオテック社製) に通塔した。カラムを 0.1 M KCl を含む A 緩衝液、50 ml で洗浄後、0.1~0.6 M KCl の直線的な濃度勾配を付けた A 緩衝液、40 ml (総量) を通塔し、ヘパリンに結合した蛋白質を溶出し、溶出液を 2 ml ずつ分画した。溶出した各画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって分析することにより、野生型 P53、変異型 P53His273、および P53Trp248 蛋白質を高濃度に含む画分、各 8 ml を回収した。デンストメーターにより定量した P53 蛋白質の濃度は、野生型 : 212 μ g/ml、変異型 P53His273 : 230 μ g/ml、P53Trp248 : 20 μ g/ml であった。

野生型および変異型 P53 蛋白質を用いたゲルシフト実験

5'-末端に蛍光標識を有し、中央部に P53 結合配列〔ネイチャー・ジェネティックス(Nature Genetics), 1 巻, 45 頁 (1992 年) 〕を含む相補配列よりなる以下の 2 本のオリゴヌクレオチド (配列 10、11) を、FluorePrimeTM (ファルマシアバイオテック社) を用いて合成した (DNA 合成機は ABI 社、Model392 を使用)。

(配列 10、11)

5'-TCGAGAGACATGCCTAGACATGCCTG-3'

5'-TCGACAGGCATGTCTAGGCATGTCTC-3'

上記 2 本のオリゴヌクレオチド各 200 pmol を 0.2 ml の緩衝液〔10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、1 mM EDTA、以後、本緩衝液を TE 緩衝液という〕に溶解し、70 °C、10 分保温した後、ゆっくりと室温まで冷却することによりアニーリングを行ない、蛍光標識 P53 プローブとした。

以下の物質に蒸留水を加え、総量を 20 μ l として、4 °C で 30 分間反応させた。

- 1) 0.2 pmol 蛍光標識 P53 プローブ
- 2) 100 ng Sf9 発現野生型 P53 蛋白質または変異型 P53 蛋白質 (P53His273、P53Trp248)
- 3) 2 μ g 仔牛胸腺 DNA
- 4) 20 mM HEPES pH 7.4, 40 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 % NP-40, 1 mM DTT
- 5) 0-100 μ M 試験化合物

反応後の試料を、0.5xTBE [2.5 mM Tris-Borate (pH 8.3), 0.1 mM EDTA] を泳動緩衝液として、4 % ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した。野生型 P53 蛋白質は蛍光標識 P53 プローブに結合することで、移動度を減少させ、上方のバンドとして検出される。一方、2 種の変異型 P53 蛋白質は共にプローブに結合する活性を有さないが、試験化合物が存在すると、DNA 結合能を回復させ、移動バンドが検出されるようになる。泳動後、FluorImagerTM SI 蛍光イメージアナライザー〔モレキュラーダイナミクス (Molecular Dynamics) 社〕を用いて蛍光バンドの検出を行った。P53His273 変異体についての結果を図 1 に、P53Trp248 変異体についての結果を図 2 にそれぞれ示す。

また、各レーンについて移動したバンド中の蛍光物質の量を FluorImager^T M SI 蛍光イメージアナライザーで測定し、試験化合物を反応系に含まない試料を基準に、以下の式にしたがって活性化率を計算した。変異 P53 を用いた場合は、試験化合物非存在下ではシフトしたバンドが明確に確認できない場合もあるが、試験化合物存在下のレーンのバンドに相当する位置、大きさの範囲に含まれる蛍光物質の量を定量した。定量結果を第 2-1、2-2 表に示す。

活性化率 = B / A

A : 試験化合物非存在下におけるシフトしたバンド中の蛍光物質の量

B : 試験化合物存在下におけるシフトしたバンド中の蛍光物質の量

第 2 - 1 表 : 活性化率

化合物名	活性化率 (%)	
	p53His273	p53Trp248
化合物 1	8.0	2.2
化合物 2	10.3	1.2
化合物 3	3.3	1.8
化合物 4	37.2	6.0
化合物 5	15.0	3.5
化合物 6	22.5	11.2
化合物 7	12.4	4.4

化合物濃度 : 1 0 0 μ M

第 2 - 2 表 : 活性化率

化合物名	活性化率 (%)	
	p53His273	p53Trp248
化合物 8	5.6	未測定
化合物 11	4.1	4.4
化合物 17	5.6	未測定
化合物 18	8.7	2.8
化合物 19	9.4	1.6
化合物 20	6.8	3.3
化合物 21	5.4	3.8
化合物 22	7.0	3.4
化合物 23	10.7	5.0
化合物 24	11.8	1.9

化合物濃度 : 1 0 0 μ M

試験例 2 培養細胞抽出液を用いた変異 P53 の DNA 結合回復活性の測定

ヒト類表皮癌細胞 A431 (American Type Culture Collection, ATCC CRL-1555) 内の p53 遺伝子はコドン 273 に Arg→His の変異を有することが明らかにされている〔キャンサー・リサーチ (Cancer Research), 54 巻, 2834 頁 (1994 年)〕。この細胞から核抽出液を調製し、それを用いてゲルシフト実験を行なうことにより、試験化合物が組み換え変異 P53 蛋白質のみならず、細胞内で発現している変異 P53 蛋白質の DNA 結合活性も回復させることを以下の通り明らかにした。

A431 細胞からの核抽出液の調製

ヒト A431 細胞を $1\sim 2\times 10^5$ 細胞/ml になるように、10 % 牛胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle medium、以後、DMEM-FBS 培地と略称する)「ニッスイ」(日水製薬製) 10 ml に懸濁し、直径 10 cm の細胞培養用ディッシュ (岩城硝子) に 10 ml 分注した。37 °C、5 % CO₂ 存在下で 2 日間培養した後、培地を吸引除去し、5 ml の PBS 緩衝液で洗浄した。2 ml の PBS 緩衝液を加えスクレイパーを用いて細胞を剥離し、1.5 ml 容量の微量遠心チューブに移し、1,000×g、10 分間、4 °C で遠心して沈殿を回収した。沈殿を 0.4 ml の緩衝液〔20 mM HEPES (pH 7.9)、50 mM NaCl、1 mM EDTA、10 %グリセロール、0.1 % NP-40、1 mM DTT、1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド (以後、PMSF と略称する)、1 mM Na₃VO₄、1 mg/ml ロイペプチン〕に懸濁し、10 分間、0 °C で放置した後、1,000×g、10 分間、4 °C で遠心し、核画分として沈殿を回収した。沈殿を 0.4 ml の溶解緩衝液〔20 mM HEPES (pH 7.9)、50 mM NaCl、10 mM EDTA、2 mM エチレンジアミン (オキシエチレンニトリロ) 四酢酸 (以後、EGTA と略称する)、0.1 % NP-40、1 mM PMSF、1 mM Na₃VO₄、1 mg/ml ロイペプチン、以後、本緩衝液を溶解緩衝液 2 という〕に懸濁し、10~20 分間、4 °C で激しく振盪した

。10,000×g、10 分間、4 °Cで遠心し、上清を回収し粗核抽出液とした。抽出液中の蛋白質濃度はプロテインアッセイキット（バイオラッド社製）を用いて測定した。3.5 mg/ml の蛋白質溶液が 0.4 ml 取得された。

A431 細胞抽出液を用いたゲルシフト実験

取得した A431 細胞核抽出液を用い、前項と同じ蛍光 P53 結合配列 DNA プローブを用いてゲルシフト実験を行なった。以下の物質に蒸留水を加え、総量を 20 μ lとして、4 °Cで 30 分間反応させた。

- 1) 0.2 pmol 蛍光標識 P53 プローブ
- 2) 35 μ g A431 細胞核抽出液（蛋白質質量換算）
- 3) 2 μ g poly(dI-dC) · poly(dI-dC)（ファルマシア・バイオテク）
- 4) 20 mM HEPES pH 7.4, 40 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 % NP-40, 1 mM DTT
- 5) 0-100 μ M 試験化合物

反応後の試料を、0.5xTBE [2.5 mM Tris-Borate (pH 8.3), 0.1 mM EDTA] を泳動緩衝液として、4 % ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した。A431 細胞中の P53 蛋白質は変異型 (273Arg→His) であるのでプローブに結合する活性を有さないが、試験化合物が存在すると、DNA 結合能を回復させ、移動バンドが検出されるようになる。泳動後、FluorImagerTMSI 蛍光イメージアナライザー（モレキュラーダイナミクス社）を用いて、蛍光バンドの検出を行った。結果を図 3 に示す。各レーンについて移動したバンド中の蛍光物質の量を FluorImagerTMSI 蛍光イメージアナライザーで測定し、試験化合物を反応系に含まない試料を基準に、以下の式にしたがって活性化率を計算した。試験化合物非存在下ではシフトしたバンドが確認できない場合もあるが、試験化合物存在下のレーンのバンドに相当する位置、大きさの範囲に含まれる蛍光物質の量を定量した。定量結果を第 3-1、3-2 表に示す。

活性化率 = B/A

A : 試験化合物非存在下におけるシフトしたバンド中の蛍光物質の量

B : 試験化合物存在下におけるシフトしたバンド中の蛍光物質の量

第 3 - 1 表

化合物名	活性化率 (%)
化合物 1	3.3
化合物 2	4.6
化合物 3	3.7
化合物 4	5.2
化合物 5	5.3
化合物 6	3.3
化合物 7	3.4

化合物濃度 : 1 0 0 μ M

第 3 - 2 表

化合物名	活性化率 (%)
化合物 8	4.0
化合物 11	3.8
化合物 17	3.0
化合物 18	3.4
化合物 19	5.8
化合物 20	4.6
化合物 21	2.9
化合物 22	5.7
化合物 23	3.8
化合物 24	2.5

化合物濃度 : 1 0 0 μ M

試験例 3 P53 依存性転写活性化活性の測定

遺伝子 p53 に変異を有している細胞に試験化合物を導入することにより、

変異 P53 が転写活性を回復し、P53 依存性の転写が増強することを、ルシフェラーゼレポーターを用いた実験により以下の方法で確認した。

P53応答レポータープラスミドの造成

以下の方法に従って P53 応答配列を転写制御領域に 8 コピー有し、その下流にホタルルシフェラーゼ (luciferase) 遺伝子をレポーター遺伝子として有するプラスミド p53RE8luc2 を造成した。造成の概略は図 4 に示した。

ネオマイシン (neomycin) 耐性遺伝子を有するルシフェラーゼレポーターベクターpluc2〔ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・ヘマトロジー (European Journal of Haematology), 52 巻, 73 頁 (1994 年)〕の制限酵素 XhoI、HindIII 部位に、SV40 初期遺伝子のコアプロモーター領域の 200 塩基対からなる SphI-HindIII 断片〔128-0/5243-5171、塩基の番号はツーズ編(Tooze, J.) モレキュラー・バイオロジー・オブ・テューモア・ウィルス (Molecular Biology of Tumor Viruses, 2nd Ed., Part 2 Revised. DNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1982) による〕、および下記の 2 本の合成オリゴヌクレオチド (配列 1 2、1 3) をアニーリングさせて得られる両端に XhoI, SphI 部位を有し内部に SmaI, Asp718(KpnI) 部位を有する断片

(配列 1 2、1 3)

5'-TCGAGCCCGGGGTACCGCATG-3'

5'-CGGTACCCCGGGC-3'

を挿入して、転写制御領域挿入用ルシフェラーゼレポーターベクター pSE0luc2 を造成した。

次に P53 応答配列を内部に有する互いに相補的な下記の 2 本のオリゴヌクレオチド (配列 1 4、1 5)

5'-TCGAGGGACTTGCCTGGACTTGCCTGTCGACG-3'

5'-GTACCGTCGACAGGCAAGTCCAGGCAAGTCCC-3'

をアニーリングさせ、上で造成したルシフェラーゼベクター pSE0luc2 の XhoI, Asp718 部位に挿入し、転写制御領域に P53 応答配列を 1 コピー有するレポータープラスミド p53RE1luc2 を造成した。

この p53RE1luc2 を制限酵素 XhoI, MluI で同時に切断し、アガロースゲル電気泳動で分離することで、5.3 kb からなる XhoI-MluI DNA 断片を得た。また、同じく p53RE1luc2 を制限酵素 SalI, MluI で同時に切断し 2.6 kb からなる MluI-SalI DNA 断片を得た。この両断片をライゲーションすることで、P53 応答配列を 2 コピー有するレポータープラスミド p53RE2luc2 を造成した（図 5 参照）。

同様に p53RE2luc2 を制限酵素 XhoI, MluI で同時に切断し、アガロースゲル電気泳動で分離することで、5.3 kb からなる XhoI-MluI DNA 断片を得た。また、同じく p53RE2luc2 を制限酵素 SalI, MluI で同時に切断し 2.6 kb からなる MluI-SalI DNA 断片を得た。この両断片をライゲーションすることで、P53 応答配列を 4 コピー有するレポータープラスミド p53RE4luc2 を造成した（図 6 参照）。

得られた p53RE4luc2 に対して上記と同様の方法を繰り返すことにより、P53 応答配列を 8 コピー有するレポータープラスミド p53RE8luc2 を造成した（図 7 参照）。

細胞への DNA と試験化合物の導入

試験化合物の細胞への導入は DNA トランスフェクション用リポソーム試薬 DOSPERTM（ベーリンガーマンハイム社製）を用いた。

ヒト類表皮癌細胞 (Human Epidermoid carcinoma) 株、A431 (American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1555) を 4×10^5 個/well の細胞密度で細胞培養用 6 穴ディッシュ（直径 35 mm、岩城硝子社製）にまき、DMEM-FBS 培地中で、37 °C、5 % CO₂ 存在下で 24 時間、培養した。さらに、試験化合物 50 nmol とレポータープラスミド p53RE8luc2、2 μ g を緩衝液（20 mM

HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、以後 HBS 緩衝液という) に溶解し、最終容量を100 μ lとした(溶液 Aとする)。同じく HBS 緩衝液に 5 μ l のドスパー(Dosper) 溶液を加え、最終容量を 100 μ lとした(溶液 B とする)。A、B 両溶液を静かに混合し、室温で15 分間放置後、0.8 ml の Opti-MEM[®]I 培地(Gibco BRL) を加えた。

上記 6 穴ディッシュで培養した A431 細胞の培地を吸引により除き、2 ml の Opti-MEM[®]I 培地 (Gibco BRL) で洗浄した後、上記の方法で調製した A、B 混合液 1 ml を静かに細胞の上に加えた。37 °C、5 % CO₂ 存在下で、6 時間培養し、さらに 1 ml の DMEM-FBS 培地を加え、さらに 24 時間培養した。試験化合物の最終濃度は 25 μ M となる。

P53 依存性転写活性化活性の測定

上記細胞を 24 時間培養後、細胞をスクレイパーで剥離し、遠心分離で回収した。細胞を溶解用緩衝液〔1 % Triton X 100, 100 mM KH₂PO₄ (pH 7.8) , 1 mM DTT〕 0.5 ml に懸濁後、遠心して上清をとり 200 μ l を用いてルシフェラーゼ活性を測定し、10 μ l を用いて蛋白質濃度を測定した。ルシフェラーゼ活性の測定はルミノメーターLB953 (ベルトールド社) を用い、基質溶液〔25 mM グリシルグリシン (glycylglycine) (pH 7.8) , 15 mM MgSO₄, 5 mM ATP, 0.33 mM ルシフェリン (luciferin) 〕 300 μ l を自動注入後、10 秒間の発光量を測定し、ルシフェラーゼ活性とした。また、蛋白質濃度は BIO-RAD プロテインアッセイキット (BIO-RAD社) を用いて測定し、その値を用いてルシフェラーゼ活性を補正した。また、試験化合物を反応系に含まないサンプルのルシフェラーゼ活性(蛋白質濃度で補正)を基準に、以下の式にしたがって活性化率を計算した。結果を第 4 表に示す。

第 4 表

化合物名	活性化率 (%)
化合物 1	1.4
化合物 4	6.3
化合物 8	3.9
化合物 23	5.0

活性化率 = B / A

A : 試験化合物非存在下におけるルシフェラーゼ活性 (蛋白質濃度で補正)

B : 試験化合物存在下におけるルシフェラーゼ活性 (蛋白質濃度で補正)

試験例 4 A431 細胞に対する増殖阻害活性の測定

DMEM-FBS 培地中で、37 °C、5 % CO₂ 存在下で培養したヒト類表皮癌細胞株 A431、 1×10^6 個を、50 μ l の緩衝液 (137 mM KCl, 2.7 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 4 mM MgCl₂、以後、本緩衝液を K-PBS 緩衝液という) に懸濁し、K-PBS 緩衝液で適宜希釈した試験化合物を最終濃度 100 μ M になるように加えた。この懸濁液を 0.2 cm 幅のキュベット (BIO-RAD 社) に移し、島津細胞融合装置 S-SH-1 (島津製作所製) を用いて (電圧 3 kV/cm、パルス幅 100 μ s、パルス間隔 1 s、パルス回数 2 回) の条件で電気パルスをかけた。キュベットを 10 分間静置後、細胞を回収して DMEM-FBS 培地に懸濁し、96 穴マイクロタイタープレート (Nunc 社製、#167008) に 1×10^3 個/Well になるように細胞を分注した。そこに、終濃度 100 μ M になるように電気パルスをかけた際に用いたのと同種の試験化合物を加えた。

その細胞を 37 °C、5 % CO₂ 存在下で、6 日間培養した。培養が終了する 3 時間前に、培地を除去し、1 well あたり 100 μ l の PBS 緩衝液で 1 回洗浄した後、DMEM-FBS 培地を 1 well あたり 50 μ l 加えた。さらに 1 mg/ml の XTT (sodium 3-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-

methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate) と 25 μ M の PMS (N-methyl dibenzopyrazine methylsulfate) を RPMI1640 に溶解させた XTT 標識試薬 (ベーリンガーマンハイム社製) を 1 well あたり 25 μ l ずつ分注した。培養終了後、マイクロプレートリーダー Model550 (Bio-Rad 社製) で、490 nm の吸光度を測定した。対照波長としては 655 nm を用いた。バックグラウンド (細胞なし) の値を差し引いた後、試験化合物を入れずに電気パルスのかけた場合の吸光度を基準とし、以下の式に従って、増殖阻害率を計算した。結果を第 5 表に示す。

第 5 表

化合物名	生育阻害率 (%)
化合物 1	1 6
化合物 4	5 0
化合物 6	7 6

$$\text{阻害率} = (A - B) / A \times 100 \quad (\%)$$

A : 試験化合物非存在下における吸光度 (A490-A655)

B : 試験化合物存在下における吸光度 (A490-A655)

(A490、A655 は 490 nm、655 nm における吸光度をそれぞれ示す)

以上の試験例より、本発明のペプチドは、変異 P53蛋白質のDNA結合活性を回復させることができ、P53蛋白質依存性の転写活性を回復させることができ、さらに癌細胞の増殖阻害活性を有するので、癌の治療薬として有用であることが確認された。

図面の簡単な説明

図 1 は、P53His273 蛋白質を用いたゲルシフト実験の結果を示した電気泳動

の図である。各レーンの上部に用いた試験化合物の種類と濃度 (μM) を示した。

図 2 は、P53Trp248 蛋白質を用いたゲルシフト実験の結果を示した電気泳動の図である。各レーンの上部に用いた試験化合物の種類と濃度 (μM) を示した。

図 3 は、A431 細胞抽出液を用いたゲルシフト実験の結果を示した電気泳動の図である。各レーンの上部に用いた試験化合物の種類と濃度 (μM) を示した。

図 4 は、レポータープラスミド p53RE1luc2 の造成の概略を示す。略号は以下の意味を表す。PSE: Sv40 初期遺伝子コアプロモーター、SPBG: ウサギ β -グロビン遺伝子由来イントロン、ABG: ウサギ β -グロビン由来ポリ A 付加シグナル、ASE: Sv40 初期遺伝子由来ポリ A 付加シグナル、Atk: 単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ由来ポリ A 付加シグナル、G418: Tn5 由来 G418/カナマイシン耐性遺伝子、Ptk: 単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼプロモーター、P1: pBR322 由来 P1 プロモーター、Ap: アンピシリン耐性遺伝子、p53RE: p53 応答配列、GC: GC ボックス、TATA: TATA ボックス

図 5 は、レポータープラスミド p53RE2luc2 の造成の概略を示す。略号は図 4 と同義である。

図 6 は、レポータープラスミド p53RE4luc2 の造成の概略を示す。略号は図 4 と同義である。

図 7 は、レポータープラスミド p53RE8luc2 の造成の概略を示す。略号は図 4 と同義である。

発明を実施するための最良の形態

以下の参考例および実施例において、化合物の理化学的性質は次の方法により測定した。

質量分析は、日本電子 JMS-SX102A を用い FAB-MS 法により行った。アミノ酸分析は、ビドリグマイヤー (Biddingmeyer, B. A.) らの方法〔ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー (Journal of Chromatography), 336 巻, 93 頁 (1984 年)〕により行った。加水分解は塩酸蒸気中 110 °C で 22 時間行い、加水分解物のアミノ酸組成はウオーターズ・ピコ・タグ (Waters Pico Tag) アミノ酸分析計 (Waters 社製) を用い分析した。

参考例 1 化合物 1 (H-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-OH) の合成

Fmoc-Leu 18 μmol が結合した担体樹脂 (Wang レジン) 30 mg を自動合成機 (島津製作所製 PSSM-8) の反応器に入れ、島津製作所の合成プログラムに従い次の操作を行った。

(a) 担体樹脂を DMF により 3 分間洗浄し、該溶液を排出した。

(b) 30 % ピペリジン-DMF 溶液 755 μl を加えて混合物を 4 分間攪拌し、該溶液を排出し、この操作をもう 1 回繰り返した。

(c) 担体樹脂を DMF で 1 分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を 5 回繰り返した。

こうして、Fmoc 基を除去した Leu の結合した担体樹脂を得た。

(d) Fmoc-Lys(Boc)-OH 180 μmol 、PyBOP 180 μmol 、HOBt 1 水和物 180 μmol および NMM 270 μmol を DMF 630 μl 中で 3 分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を 30 分間攪拌し、溶液を排出した。

(e) 担体樹脂を DMF で 1 分間洗浄し、これを 5 回繰り返した。こうして、Fmoc-Lys(Boc)-Leu が担体上に合成された。

次に、(a) ~ (c) の洗浄、脱保護工程を行った後、(d) の工程で Fmoc-Lys(Boc)-OH を用いて縮合反応を行い、次いで (e) の洗浄工程を経て、Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu が担体上に合成された。以下、工程 (d) において、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-

Thr(t-Bu)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH を順次用いて、(a) ~ (e) を繰り返し、保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。さらに、(a) ~ (c) の洗浄、脱保護工程を行った後、担体樹脂を DMF で 1 分間洗浄し、これを 5 回繰り返した後、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄後、減圧下 12 時間乾燥して、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、TFA (82.5 %)、チオアニソール (5 %)、水 (5 %)、エチルメチルスルフィド (3 %)、1,2-エタンジチオール (2.5 %) およびチオフェノール (2 %) からなる混合溶液 600 μ l を加えて室温で 8 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約 10 ml を加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、粗ペプチドとして 51.8 mg を取得した。この粗生成物を 2 M 酢酸に溶解後、逆相カラム (資生堂製、CAPCELL PAK C18 30 mm I.D. \times 250 mm) を用いた HPLC で精製した。0.1 % TFA 水溶液に、TFA 0.1 % を含む 90 % アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220 nm で検出し、標記化合物を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、化合物 1 を 21.9 mg 得た。

質量分析 FAB-MS: 1726.4 ($M + H^+$)

アミノ酸分析: Glx 1.1 (1), Ser 2.7 (3), Gly 1.0 (1), His 1.0 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Leu 1.8 (2), Lys 5.2 (5)

参考例 2 化合物 2 (H-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-OH) の合成

Fmoc-Lys(Boc) 18.3 μ mol が結合した担体樹脂 30 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様にして、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Thr(t-Bu)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、

Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例 1 と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 42.7 mg を取得し、参考例 1 と同様に逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 2 を 14.1 mg 得た。

質量分析 (FAB-MS) m/z : 1500.2 ($M + H^+$)

アミノ酸分析: Glx 1.1 (1), Ser 2.8 (3), Gly 1.0 (1), His 1.0 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Lys 5.1 (5)

参考例 3 化合物 3 (H-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-OH) の合成

Fmoc-Lys(Boc) 30.5 μmol が結合した担体樹脂 50 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様にして、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Thr(t-Bu)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例 1 と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 54.4 mg を取得し、参考例 1 と同様に逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 3 を 41.4 mg 得た。

質量分析 (FAB-MS) m/z : 1284.6 ($M + H^+$)

アミノ酸分析: Glx 1.1 (1), Ser 1.9 (2), Gly 1.1 (1), His 1.0 (1), Arg 0.9 (1), Thr 1.0 (1), Lys 3.8 (4)

実施例 1 化合物 4 [H-cyclo(Cys-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-Cys)-OH] の合成

Fmoc-Cys(Trt) 25 μmol が結合した担体樹脂 45.4 mg を出発物質とし、ACT 社のペプチド合成機 (ACT357) を用いて、次の操作を行った。

(a) 担体樹脂を DMF 1 ml により 30 秒間洗浄し、該溶液を排出した。

(b) 25 % ピペリジン-DMF 溶液 1 ml 加えて混合物を 2 分間攪拌し、該溶液を排出し、さらに 25 % ピペリジン-DMF 溶液 1 ml を加えて混合物を 10 分間攪拌し、該溶液を排出した。

(c) 担体樹脂を DMF で 12 秒間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を 7 回繰り返した。

こうして、Fmoc基を除去したCys(Trt)の結合した担体樹脂を得た。

(d) DMF 125 μ l、Fmoc-Leu-OH と HOBt 1 水和物とをそれぞれ 0.25 M の濃度で含む NMP 溶液 500 μ l、PyBOPを 0.25 M の濃度で含む DMF 溶液 500 μ l、および NMM を 2.0 M の濃度で含む DMF 溶液 125 μ l を樹脂に加えて 60 分間攪拌し、溶液を排出した。

(e) 反応容器を 500 μ l のDMFで洗浄後、1 ml の DMF で 30 秒間洗浄し、さらに再度 500 μ l の DMF で洗浄した。こうして、Fmoc-Leu-Cys(Trt) が担体上に合成された。

次に、(a) ~ (c) の洗浄、脱保護工程を行った後、(d) の工程で Fmoc-Leu-OH に代わり Fmoc-Lys(Boc)-OH を含む溶液を用いて縮合反応を行い、次いで (e) の洗浄工程を経て、Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Cys(Trt) が担体上に合成された。以下、工程(d)において、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Thr(t-Bu)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂 145.1 mg を得た。参考例 1 と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 68.5 mg を取得した。これを、3ml の DMF に溶解し、pH 9.5 の希アンモニア水 1 ml を加えて室温で 30 分間放置した。これを、参考例 1 と同様に逆相カラム (YMC 製、YMC-Pack ODS-AM 30 mm I.D. x 250 mm) を用いた HPLC で精製し、化合物 4 を 12.7

mg 得た。

質量分析 (FAB-MS) m/z : 1930.1 ($M + H^+$)

アミノ酸分析: Glx 1.0 (1), Ser 3.0 (3), Gly 1.1 (1), His 1.1 (1), Arg 1.1 (1), Thr 1.0 (1), Leu 1.7 (2), Lys 5.0 (5), Cys 2.0 (2)

実施例 2 化合物 5 [cyclo (Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu)] の合成

Cl 基が 160 μmol 結合した 2-chlorotritylchloride 樹脂 (島津製作所製) 100 mg に 80 μmol に Fmoc-Leu-OH を 200 μl の DMF に溶解した後 1 ml の DCM で希釈した溶液および 10.1 μl の DIEA を加えて室温で 5 分間攪拌した。さらに 20.3 μl の DIEA と 20.3 μl の DCM を加えて室温で 45 分間攪拌した後、53.3 μl のメタノールを加えて 10 分間攪拌した。樹脂を濾別後 DCM、DMF、イソプロパノール、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し減圧下乾燥させ、Fmoc-Leu-2-chlorotritylchloride 樹脂を得た。この樹脂のうち 40 mg (理論上 32 μmol の Fmoc-Leu が結合している) に、5 % ピペリジンを含む DMF/DCM の 1/1 溶液を加えて 10 分間放置後溶液を排出し、その後参考例 1 と同様にして、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(Trt)-OH、Fmoc-Thr(Trt)-OH、Fmoc-Ser(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。ただし、アミノ酸の縮合時間は 40 分間とした。樹脂からの切り出しを、酢酸 20 %、TFE 20 %、DCM 60 %の混合液を 0.8ml 使用し放置時間を 2 時間とする以外は参考例 1 と同様に行い、側鎖保護基の付いた粗ペプチド 63.8 mg を取得した。

質量分析 (FAB-MS) m/z : 3704.9 ($M + H^+$)

得られた粗ペプチドに 5 % TFA、5 % TFE、5 % トリイソプロピルシラン、

85 % DCM の混合液 1 ml を加え室温で 5 分間放置後、参考例 1 と同様にエーテルを加えて生成する沈殿を回収し、Ser、Thr の側鎖 Trt 基のみを除去した粗ペプチド 59.8 mg を得た。

このうちの 30 mg を 30 ml の DMF に溶解後、16.6 mg の PyBOP、4.9 mg の HOBt 1 水和物、5.3 μ l の NMM を加え、4 °C で 18 時間攪拌し、減圧下溶媒を除去した。残さに、TFA (82.5 %)、チオアニソール (5 %)、水 (5 %)、エチルメチルスルフィド (3 %)、1,2-エタンジチオール (2.5 %) およびチオフェノール (2 %) からなる混合溶液 1 ml を加えて室温で 8 時間放置後、参考例 1 と同様にエーテルを加えて生成する沈殿を回収し、粗ペプチド 26.6 mg を得た。これを参考例 1 と同様に逆相カラム (資生堂製、CAPCELL PAK C18 30 mm I.D. \times 250 mm) を用いた HPLC で精製し、化合物 5 を 7.7 mg 得た。

質量分析 (FAB-MS) m/z : 1708.2 ($M + H^+$)

アミノ酸分析: Glx 1.1 (1), Ser 2.8 (3), Gly 1.2 (1), His 1.0 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Leu 1.8 (2), Lys 5.1 (5)

実施例 3 化合物 6 [H-cyclo (Cys-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-Cys) -NH₂] の合成

Fmoc-NH 16.5 μ mol が結合した担体樹脂 (Rink Amide MBHA レジン) 30 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様にして、Fmoc-Cys (Trt) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Arg (Pmc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Thr (t-Bu) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Cys (Trt) -OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例 1 と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 35.8 mg を取得した。これを、40 ml

の水に溶解し、希アンモニア水を加えて pH を 7.7 に調整し、室温で 20 時間攪拌した。反応液を、参考例 1 と同様に逆相カラム（資生堂製 CAPCELL PAK C18 30 mm I.D. × 250 mm）を用いた HPLC で精製し、化合物 6 を 3.5 mg 得た。

質量分析 (FABMS) m/z : 1931.9 ($M + H^+$)

アミノ酸分析: Glx 0.9 (1), Ser 2.8 (3), Gly 1.0 (1), His 1.2 (1), Arg 1.1 (1), Thr 1.0 (1), Leu 2.1 (2), Lys 4.9 (5), Cys 2.1 (2)

実施例 4 化合物 7 [Ac-cyclo (Cys-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-Cys) -NH₂] の合成

Fmoc-NH 16.5 μ mol が結合した担体樹脂 (Rink Amide MBHA レジン) 30 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様にして、Fmoc-Cys (Trt) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Arg (Pmc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Thr (t-Bu) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Cys (Trt) -OH を順次縮合した後に、DMF 495 μ l および無水酢酸 32.4 μ l を加え室温で 1 時間攪拌した。洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例 1 と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 37.1 mg を取得した。これを、40 ml の水に溶解し、希アンモニア水を加えて pH を 7.7 に調整し、室温で 20 時間攪拌した。反応液を、参考例 1 と同様に逆相カラム（資生堂製 CAPCELL PAK C18 30 mm I.D. × 250 mm）を用いた HPLC で精製し、化合物 7 を 4.5 mg 得た。

質量分析 (FABMS) m/z : 1974.0 ($M + H^+$)

アミノ酸分析: Glx 0.9 (1), Ser 2.9 (3), Gly 1.0 (1), His 1.2 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Leu 2.0 (2), Lys 4.8 (5), Cys 1.7 (2)

実施例 5 化合物 8 [H-cyclo-(Cys-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-Cys-Add)-NH₂] の合成

Fmoc-NH 16.5 μ mol が結合した担体樹脂 (Rink Amide MBHA レジン) 30 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様にして、Fmoc-Add-OH、Fmoc-Cys (Trt) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Arg (Pmc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Thr (t-Bu) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Cys (Trt) -OH を順次縮合した。ただし、工程 (d)においては、各アミノ酸、HBTU、HOBt 1 水和物、各々148.5 μ mol、および DIEA 297 μ mol を DMF 773 μ l 中で 5 分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を 60 分間攪拌し、溶液を排出した。全行程終了後、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例 1 と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 44.6 mg を取得した。これを、50 ml の水に溶解し、希アンモニア水を加えて pH を 7.5 に調整し、室温で 18 時間攪拌した。反応液を、参考例 1 と同様に逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 8 を 11.2 mg 得た。

質量分析 (FABMS) m/z: 2127.2 (M+H⁺)

アミノ酸分析: Glx 0.9 (1), Ser 2.9 (3), Gly 1.1 (1), His 1.1 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Leu 2.0 (2), Lys 5.1 (5), Cys 2.2 (2)

実施例 6 化合物 11 [H-cyclo-(Cys-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys(Ac)-Lys-Leu-Cys-)-NH₂] の合成

Fmoc-NH 27.5 μ mol が結合した担体樹脂 (Rink Amide MBHA レジン) 50 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様にして、Fmoc-Cys (Trt) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Lys(Mtt) -OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Arg (Pmc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Thr (t-Bu) -OH、Fmoc-Ser

(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Boc-Cys(Trt)-OH を順次縮合した。ただし、工程(d)においては、各アミノ酸、HBTU、HOBt 1 水和物、各々 275 μ mol、および DIEA 550 μ mol を DMF 1430 μ l 中で 5 分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を 60 分間攪拌し、溶液を排出した。Boc-Cys(Trt)-OH の縮合後の脱保護工程は行わなかった。全行程終了後、DCM で樹脂を洗浄し、酢酸/TFE/DCM (2/2/6) 混合液 2ml を加えて、室温で 2 時間放置した。溶液を排出し、参考例 1 と同様に洗浄、乾燥を経て、Lys の側鎖 Mtt 基のみ除去された側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。得られた樹脂の 40%相当分に、無水酢酸 20.8 μ l を含む DMF 500 μ l を加え、室温で 3 時間攪拌した後溶液を排出、洗浄、乾燥を行った。参考例 1 と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 26.4 mg を取得した。これを、2M 酢酸に溶解した後水で 35 ml に希釈し、希アンモニア水を加えて pH を 7.5 に調整し、室温で 3 日間攪拌した。反応液を、参考例 1 と同様に逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 11 を 2.3 mg 得た。

質量分析 (FABMS) m/z: 1971.1 (M+H⁺)

アミノ酸分析: Glx 0.9 (1), Ser 2.9 (3), Gly 1.1 (1), His 1.3 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.1 (1), Leu 1.8 (2), Lys 4.9 (5), Cys 2.2 (2)

実施例 7 化合物 17 [H-cyclo(Cys-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-Cys)-OH] の合成

Fmoc-Cys(Trt) 25 μ mol が結合した担体樹脂 54 mg を出発物質とし、実施例 1 と同様にして、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Thr(t-Bu)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を

経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例 1 と同様に
して側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 64.5
mg を取得した。これを、50 ml の水に溶解し、希アンモニア水を加えて pH
を 7.6 に調整し、室温で 2 日間攪拌した。反応液を、参考例 1 と同様に逆
相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 17 を 14.1 mg 得た。

質量分析 (FABMS) m/z : 1874.0 ($M+H^+$)

アミノ酸分析: Glx 1.0 (1), Ser 2.9 (3), His 1.1 (1), Arg 1.0 (1), Thr
1.0 (1), Leu 2.0 (2), Lys 5.0 (5), Cys 1.5 (2)

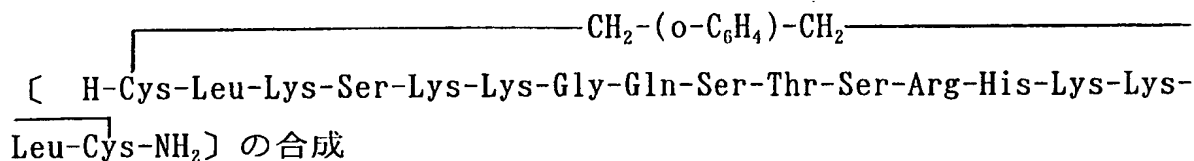
実施例 8 化合物 18 [cyclo(-CH₂CO-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-Cys)-NH₂] の合成

Fmoc-NH 27.5 μ mol が結合した担体樹脂 (Rink Amide MBHA レジン) 50
mg を出発物質とし、参考例 1 と同様にして、Fmoc-Cys (Trt) -OH、Fmoc-
Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-His (Trt) -OH
、Fmoc-Arg (Pmc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Thr (t-Bu) -OH、Fmoc-Ser
(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys
(Boc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Leu-OH、
ブロモ酢酸 を順次縮合した。ただし、工程(d)においては、各アミノ酸、
DIC 330 μ mol、HOBt 1 水和物、DIEA 各々 275 μ mol を DMF 1430 μ l 中
で 5 分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を 60 分間攪拌し、
溶液を排出した。ブロモ酢酸の縮合後の脱保護工程は行わなかった。全行
程終了後、メタノール、ブチルエーテルで樹脂を洗浄後乾燥し、保護ペ
プチドの結合した樹脂を得た。参考例 1 と同様にして側鎖保護基の切断なら
びに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 50.7 mg を取得した。これを
、2M 酢酸に溶解した後水で 50 ml に希釈し、希アンモニア水を加えて pH
を 7.8 に調整し、室温で 3 日間攪拌した。反応液を、参考例 1 と同様に逆
相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 18 を 4.2 mg 得た。

質量分析 (FABMS) m/z : 1869.1 ($M+H^+$)

アミノ酸分析: Glx 0.8 (1), Ser 2.8 (3), Gly 1.1 (1), His 1.3 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.1 (1), Leu 1.9 (2), Lys 5.0 (5), Cys 1.0 (1), ブロモ酢酸は分析せず

実施例 9 化合物 19



化合物 6 と同配列を有するペプチドを実施例 3 と同様にして合成した。ただし Fmoc-アミノ酸の縮合反応には、PyBOP の代わりに HBTU を、NMM の代わりに DIEA を用いた。Fmoc-NH 82.5 μ mol が結合した担体樹脂 (Rink Amide MBHA レジン) 150mg を出発物質とし、粗ペプチド 197.2mg を取得し、2 つの Cys の側鎖が遊離のチオール基となっているままの状態、逆相カラムを用いた HPLC で精製し、精製ペプチド 23.4mg を得た。

このうち 10.2mg を 0.1%TFA、10%メタノールを含む水 100ml に溶解し、 α -ジブロモキシレン 1.4mg の 0.5ml メタノール溶液を加えた後、希アンモニア水で pH7.5 に調整し室温で 30 時間攪拌した。参考例 1 と同様に逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 19 を 2.2mg 得た。

質量分析 (FAB-MS) m/z : 2034.2 ($M + H^+$)

アミノ酸分析: Glx 0.9 (1), Ser 2.9 (3), Gly 1.1 (1), His 1.1 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Leu 2.0(2), Lys 4.9 (5), Cys は分析せず

実施例 10 化合物 20 [H-Leu-Lys-cyclo(Cys-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-Cys)-NH₂] の合成

Fmoc-NH 22 μ mol が結合した担体樹脂 (Rink Amide MBHA レジン) 40 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様にして、Fmoc-Cys (Trt) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Arg (Pmc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Thr (t-Bu) -OH、Fmoc-Ser

(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH を順次縮合した。ただし、工程(d)においては、各アミノ酸、HBTU、HOBt 1 水和物、各々220 μ mol、および DIEA440 μ mol を DMF 624 μ l 中で5分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を60分間攪拌し、溶液を排出した。全行程終了後、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例1と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド55.7 mg を取得した。これを、55.7 ml の水に溶解し、希アンモニア水を加えて pH を 7.58 に調整し、室温で2日間攪拌した。反応液を、参考例1と同様に逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物20を10.1 mg 得た。

質量分析 (FABMS) m/z: 1843.1 (M+H⁺)

アミノ酸分析: Glx 0.9 (1), Ser 1.9 (2), Gly 1.0 (1), His 1.2 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Leu 2.0 (2), Lys 5.1 (5), Cys 2.9 (2)

実施例 11 化合物 21 [H-cyclo(Cys-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Cys)-Arg-His-Lys-Lys-Leu-NH₂] の合成

Fmoc-NH 22 μ mol が結合した担体樹脂 (Rink Amide MBHA レジン) 40 mg を出発物質とし、参考例1と同様にして、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Thr(t-Bu)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH を順次縮合した。ただし、工程(d)においては、各アミノ酸、HBTU、HOBt 1 水和物、各々220 μ mol、および DIEA440 μ mol を DMF 624 μ l 中で5分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を60分間攪拌し、溶液を排出した。全行程終了後、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例1と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹

脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 57.8 mg を取得した。これを、57.8 ml の水に溶解し、希アンモニア水を加えて pH を 7.78 に調整し、室温で 4 日間攪拌した。反応液を、参考例 1 と同様に逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 21 を 2.3 mg 得た。

質量分析 (FABMS) m/z : 1843.1 ($M+H^+$)

アミノ酸分析: Glx 0.9 (1), Ser 1.9 (2), Gly 1.0 (1), His 1.1 (1), Arg 1.0 (1), Thr 0.9 (1), Leu 2.0 (2), Lys 5.1 (5), Cys 2.5 (2)

実施例 12 化合物 22 [H-Leu-Lys-cyclo(Cys-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Cys)-Arg-His-Lys-Lys-Leu-NH₂] の合成

Fmoc-NH 22 μ mol が結合した担体樹脂 (Rink Amide MBHA レジン) 40 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様に、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Arg (Pmc) -OH、Fmoc-Cys (Trt) -OH、Fmoc-Thr (t-Bu) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Leu-OH を順次縮合した。ただし、工程(d)においては、各アミノ酸、HBTU、HOBt 1 水和物、各々 220 μ mol、および DIEA 440 μ mol を DMF 624 μ l 中で 5 分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を 60 分間攪拌し、溶液を排出した。全行程終了後、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例 1 と同様に、側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 54.6mg を取得した。これを、54.6 ml の水に溶解し、希アンモニア水を加えて pH を 7.82 に調整し、室温で 4 日間攪拌した。反応液を、参考例 1 と同様に逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 22 を 7.0 mg 得た。

質量分析 (FABMS) m/z : 1755.9 ($M+H^+$)

アミノ酸分析: Glx 0.9 (1), Ser 0.9 (1), Gly 1.0 (1), His 1.1 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Leu 2.0 (2), Lys 5.1 (5), Cys 2.5 (2)

実施例 13 化合物 23 [H-cyclo (Cys-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-Cys) -Gly-NH-(CH₂)₃-CH₃] の合成

Cl 基が 80 μ mol 結合した 2-chlorotritylchloride 樹脂 (島津製作所製) 50 mg に、40 μ mol の Fmoc-Gly-OH を 30 μ l の DMF に溶解し 720 μ l の DCM で希釈した溶液および 16 μ l の DIEA を加えて室温で 5 分間攪拌した。さらに 11 μ l の DIEA と 11 μ l の DCM を加えて室温で 1 時間攪拌した後、40 μ l のメタノールを加えて 10 分間攪拌した。樹脂を濾別後 DCM、DMF、イソプロパノール、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し減圧下乾燥させ、Fmoc-Gly-2-chlorotrityl 樹脂を得た。この樹脂に、5 % ピペリジンを含む DMF/DCM の 1/1 混合液を加えて 10 分間放置後溶液を排出し、自動合成機を用いて参考例 1 と同様にして、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Boc-Cys(Trt)-OH、を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。ただし、アミノ酸の縮合時間は 60 分間とした。樹脂からの切り出しを、酢酸 20 %、TFE 20 %、DCM 60 %の混合液を 1.0ml 使用し放置時間を 2 時間とする以外は参考例 1 と同様に行い、側鎖および N 末保護基の付いた粗ペプチド 82.9 mg を取得した。この粗ペプチドの 41.5mg を PyBOP 13mg、HOBt・1 水和物 3.2mg、NMM 2.6 μ l、n-ブチルアミン 2.5 μ l を含む DMF 1.5 ml に加え室温で 60 時間放置後、DMF を減圧留去し、粗ペプチド-n-ブチルアミドを得た。側鎖および N 末保護基の除去には TFA 82.5%、水 5%、チオアニソール 5%、エチルメチルスルフィド 3%、1, 2-エタンジチオール 2.5%、チオフエノール 2%の混合溶液を 0.8ml 用い、室温で 8 時間放置後、参考例 1 と同様にエーテルを加えて生成する沈殿を回収し、粗ペプチド 31.8 mg

を得た。これを参考例 1 と同様に逆相カラムを用いた HPLC で精製し、2 つの Cys の側鎖が遊離のチオール基となっている精製ペプチドを 7.5mg 得た。これを 2 M 酢酸 0.75ml に溶解した後、水 6.75ml で希釈し、希アンモニア水を加えて pH を 7.5 に調整し、室温で 48 時間攪拌した。反応液を参考例 1 と同様に逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 23 を 5.0mg 得た。

質量分析 (FAB-MS) m/z : 2042.8 ($M + H^+$)

アミノ酸分析: Glx 1.0 (1), Ser 2.8 (3), Gly 2.1 (2), His 1.2 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Leu 2.0(2), Lys 5.0 (5), Cys 2.5 (2)

実施例 14 化合物 24 [H-Leu-Lys-cyclo (Asp-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys) -Lys-Leu-NH₂] の合成

Fmoc-NH 20 μ mol が結合した担体樹脂 (Rink Amide TGR レジン、NovaBiochem 製) 100 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様にして、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Lys(Aloc) -OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Thr(t-Bu)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asp(OAl)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Boc-Leu-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。この得られた樹脂に PdP(Ph₃)₄ 173mg を溶解させた CHCl₃/NMM/酢酸(92.5/2.5/5)の混合溶液を加え、室温で 2 時間放置した。該溶液を排出し、樹脂の洗浄には 0.5%DIEA を含む DMF 溶液、0.5%ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムを含む DMF 溶液、メタノール、ブチルエーテルを用い、それぞれ 3 回ずつ行い、側鎖のアリル保護基(Aloc、Al)のみを選択的に除去した。この樹脂を 1 ml の DMF に懸濁後、HATU32mg、DIEA24 μ l を加え、室温で 24 時間攪拌した。該溶液を排出後、樹脂を参考例 1 と同様に洗浄、乾燥後、ペプチドを切り出し、エーテルを加えて生成する沈殿を回収し、粗ペプチド 60.4mg を得た。これを参考例 1 と同様に逆相カラムを用

いた HPLC で精製し、化合物 24 を 1.8mg 得た。

質量分析 (FAB-MS) m/z : 1735.9 ($M + H^+$)

アミノ酸分析: Asx0.6(1), Glx 1.0 (1), Ser 2.1 (2), Gly 1.2 (1), His 1.2 (1), Arg 1.1(1), Thr 1.1 (1), Leu 2.0(2), Lys 4.8 (5)

産業上の利用可能性

本発明により変異 P53 蛋白質に直接作用しその DNA 結合活性を増大し転写活性を復活増強させることによる抗腫瘍作用を有する環状構造を持つペプチドおよびその薬理的に許容される塩が提供される。

配 列 表

配列番号: 1

配列の長さ: 15

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu

1

5

10

15

配列番号: 2

配列の長さ: 13

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys

1

5

10

配列番号 : 3

配列の長さ : 1 1

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys

1

5

10

配列番号 : 4

配列の長さ : 1 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : disulfide-bonds

存在位置 : 1 , 1 7

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu

1

5

10

15

Cys

配列番号 : 5

配列の長さ : 15

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 環状

配列の種類 : ペプチド

配列

Leu	Lys	Ser	Lys	Lys	Gly	Gln	Ser	Thr	Ser	Arg	His	Lys	Lys	Leu
1				5					10					15

配列番号 : 6

配列の長さ : 17

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : disulfide-bonds

存在位置 : 1, 17

特徴を表す記号 : modified-site

存在位置 : 17

他の情報 : Xaa は L-システインアミドを表す

配列

Cys	Leu	Lys	Ser	Lys	Lys	Gly	Gln	Ser	Thr	Ser	Arg	His	Lys	Lys	Leu
1					5					10					15

Xaa

配列番号：7

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 17

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：1

他の情報：Xaa は N-アセチル-L-システインを表す

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：17

他の情報：Xaa は L-システインアミドを表す

配列

Xaa Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu

1

5

10

15

Xaa

配列番号：8

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

CTAGACAGCC AGACTGCCTT CCGGGTCACT GC

32

配列番号：9

配列の長さ：3 2

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

CATGGCAGTG ACCCGGAAGG CAGTCTGGCT GT

32

配列番号：1 0

配列の長さ：2 6

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

TCGAGAGACA TGCCTAGACA TGCCTG

26

配列番号：1 1

配列の長さ：2 6

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

TCGACAGGCA TGTCTAGGCA TGTCTC

26

配列番号：1 2

配列の長さ：2 2

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

TCGAGCCCGG GGGTACCGCA TG

22

配列番号：1 3

配列の長さ：1 4

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

CGGTACCCCC GGGC

14

配列番号：1 4

配列の長さ：3 2

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

TCGAGGGACT TGCCTGGACT TGCCTGTCGA CG

32

配列番号：1 5

配列の長さ：3 2

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

GTACCGTCGA CAGGCAAGTC CAGGCAAGTC CC

32

配列番号：1 6

配列の長さ：1 8

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 1 7

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：1 8

他の情報：Xaa は 12-ドデカナミドを表す

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu

1

5

10

15

Cys Xaa

配列番号：1 7

配列の長さ：1 7

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 17

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：17

他の情報：Xaa は N-ドデシル-L-システインアミドを表す

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu

1

5

10

15

Xaa

配列番号：18

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 17

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：17

他の情報：Xaa は N-オクタデシル-L-システインアミドを表す

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu

1 5 10 15
Xaa

配列番号 : 1 9

配列の長さ : 1 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : disulfide-bonds

存在位置 : 1 , 1 7

特徴を表す記号 : modified-site

存在位置 : 1 4

他の情報 : Xaa は N⁶-アセチル-L-リジンを表す

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Xaa Lys Leu

1 5 10 15
Cys

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 1 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：1, 17

他の情報：存在位置1および17の Xaa はそれぞれメチレンを介して S
が結合した L-システインを表す

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：17

他の情報：Xaa は L-システインアミドを表す

配列

Xaa Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu

1

5

10

15

Xaa

配列番号：21

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：両形態

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：cross-links

存在位置：1, 16

他の情報：存在位置1の Lys は N⁶ が存在位置16の Leu とアミド結合
を形成する Lys を表す

配列

Lys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu

1 5 10 15

配列番号：2 2

配列の長さ：1 6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 8

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：1 6

他の情報：Xaa は L-ロイシンアミドを表す

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Cys Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Xaa

1 5 10 15

配列番号：2 3

配列の長さ：1 6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：両形態

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：cross-links

存在位置：1, 8

他の情報：存在位置 1 の Lys は N⁶ が存在位置 8 の Asp とアミド結合を形成する Lys を表す

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：1 6

他の情報：Xaa は L-ロイシンアミドを表す

配列

Lys	Leu	Lys	Ser	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Thr	Ser	Arg	His	Lys	Lys	Xaa
1				5					10					15	

配列番号：2 4

配列の長さ：1 6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：両形態

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：cross-links

存在位置：7, 1 3

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：1 5

他の情報：Xaa は L-ロイシンアミドを表す

配列

Leu	Lys	Ser	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Thr	Ser	Arg	His	Lys	Lys	Xaa
1				5					10				15	

配列番号：2 5

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 16

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Cys

1

5

10

15

配列番号：26

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：1

他の情報：存在位置1のXaaはメチレンがSに結合したN α -メチレンカルボニル-L-ロイシンを表す

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：16

他の情報：存在位置16のXaaはSが存在位置1のメチレンに結合したL-システインアミドを表す

配列

Xaa Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Xaa
 1 5 10 15

配列番号：27

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：1, 17

他の情報：存在位置1, 17のXaaはそれぞれo-キシリレンを介してS
 が結合したL-システインを表す

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：17

他の情報：存在位置17のXaaはL-システインアミドを表す

配列

Xaa Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu
 1 5 10 15

Xaa

配列番号：28

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：3, 16

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：16

他の情報：存在位置16のXaaはL-システインアミドを表す

配列

Leu	Lys	Cys	Lys	Lys	Gly	Gln	Ser	Thr	Ser	Arg	His	Lys	Lys	Leu	Xaa
1				5				10						15	

配列番号：29

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 11

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：16

他の情報：存在位置16のXaaはL-ロイシンアミドを表す

配列

Cys	Leu	Lys	Ser	Lys	Lys	Gly	Gln	Ser	Thr	Cys	Arg	His	Lys	Lys	Xaa
1				5				10						15	

配列番号：30

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：3, 10

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：15

他の情報：存在位置15のXaaはL-ロイシンアミドを表す

配列

Leu Lys Cys Lys Lys Gly Gln Ser Thr Cys Arg His Lys Lys Xaa

1

5

10

15

配列番号：31

配列の長さ：18

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 17

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：18

他の情報：存在位置18のXaaはL-グリシン-n-ブチルアミドを表す

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu

1	5	10	15
Cys Xaa			

配列番号 : 3 2

配列の長さ : 1 5

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 両形態

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : cross-links

存在位置 : 3 , 1 3

他の情報 : 存在位置 3 の Asp は C^β が存在位置 1 3 の N^ε とアミド結合を形成する Asp を表す

特徴を表す記号 : modified-site

存在位置 : 1 5

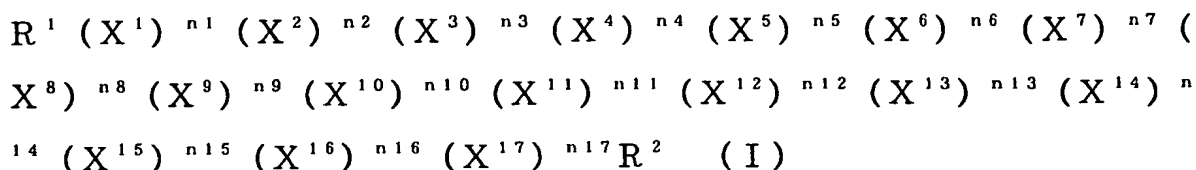
他の情報 : 存在位置 1 8 の Xaa は L-ロイシンアミドを表す

配列

Leu	Lys	Asp	Lys	Lys	Gly	Gln	Ser	Thr	Ser	Arg	His	Lys	Lys	Xaa
1				5					10					15

請 求 の 範 囲

1. 一般式 (I)



{式中、 $X^1 \sim X^{17}$ および $n_1 \sim n_{17}$ の任意の部分それぞれ X^i および n_i (但し、 i は1～17の整数から選ばれる)で表す。 X^i は以下に示すアミノ酸または有機酸の各残基を表す。 n_i は0または1を表し、 $(X^i)^{n_i}$ は、 $n_i = 1$ である場合、 X^i それ自身を表し、 $n_i = 0$ である場合、結合を表す。 $n_i = 1$ である7～17個の異なる X^i を選択し、選択された X^i を i の小さい順に並べて結合させN末端に R^1 を、C末端に R^2 を結合させることによって一つの配列を表す。各配列中、 $X^1 \sim X^{11}$ から選ばれる残基 X^p (但し、 p は1～11から選ばれる)における1官能基と $X^8 \sim X^{17}$ から選ばれる残基 X^q (但し、 q は8～17から選ばれ、 $p < q$ を満たす)における1官能基によって環状構造が形成されているものとする。 R^1 は置換もしくは非置換アルカノイル、置換もしくは非置換アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換アラルキルオキシカルボニル、置換もしくは非置換アリールオキシカルボニル、置換もしくは非置換アロイル、9-フルオレニルメトキシカルボニル、または水素を表し、 X^1 は2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、スベリン酸、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン 3-ヒドロキシプロリンまたは4-ヒドロキシプロリンの各残基を表し、 X^2 はロイシン、イソロイシン、バリン、アラ

ニン、ノルバリン、ノルロイシン、2-アミノブタン酸、ホモロイシン、 β -アラニン、 α -アミノイソブタン酸、 β -シクロプロピルアラニン、 β -クロロアラニン、1-アミノシクロペンタン-1-カルボン酸、1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸、2-アミノ-1-シクロペンタンカルボン酸、*t*-ブチルグリシン、ジェチルグリシン、*t*-ブチルアラニン、0-メチルセリン、シクロヘキシルグリシン、シクロヘキシルアラニン、またはグリシンの各残基を表し、 X^3 はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、*p*-アミノフェニルアラニン、またはグリシンの各残基を表し、 X^4 はセリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、*p*-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸の各残基を表し、 X^5 はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、*p*-アミノフェニルアラニン、またはグリシンの各残基を表し、 X^6 はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、*p*-アミノフェニルアラニン、またはグリシンの各残基を表し、 X^7 はアラニン、 β -アラニン、2-アミノ安息香酸、3-アミノ安息香酸、4-アミノ安息香酸、3-アミノメチル安息香酸、プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、L-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-7-カルボン酸、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、*p*-アミノフェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン

酸、またはグリシンの各残基を表し、 X^8 はグルタミン、アスパラギン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸の各残基を表し、 X^9 はセリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸の各残基を表し、 X^{10} はセリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸の各残基を表し、 X^{11} はセリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベ

リン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸の各残基を表し、 X^{12} はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンの各残基を表し、 X^{13} はヒスチジン、アラニン、4-チアゾリルアラニン、2-チエニルアラニン、2-ピリジルアラニン、3-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、(3-N-メチル)ピペリジルアラニン、3-(2-キノイル)アラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンの各残基を表し、 X^{14} はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 α -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、またはグリシンの各残基を表し、ここで X^{14} の側鎖のアミノ基またはグアニジノ基は R^3 (R^3 は R^1 と同義である)で修飾されてもよく、 X^{15} はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、 X^{16} はロイシン、アラニン、4-チアゾリルアラニン、2-チエニルアラニン、イソロイシン、ノルロイシン、ホモロイシン、バリン、ノルバリン、 β -アラニン、 α -アミノイソブタン酸、2-アミノブタン酸、 β -

シクロプロピルアラニン、 β -クロロアラニン、1-アミノシクロペンタン-1-カルボン酸、1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸、2-アミノ-1-シクロペンタンカルボン酸、*t*-ブチルグリシン、ジエチルグリシン、*t*-ブチルアラニン、*O*-メチルセリン、シクロヘキシルグリシン、シクロヘキシルアラニン、またはグリシンの各残基を表し、 X^{17} は 2-メルカプトアニリン、システアミン、ホモシステアミン、システイン、ホモシステイン、ベニシラミン、オルニチン、リジン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、*p*-アミノフェニルアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、または 2-アミノスベリン酸の各残基を表し、 R^2 は置換もしくは非置換アルコキシ、置換もしくは非置換アラルキルオキシ、アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換アラルキルアミノ、置換もしくは非置換アリールアミノ、またはヒドロキシを表す。さらに配列中の任意の部分において、上記 X^1 で表される有機酸もしくはアミノ酸の残基または 12-アミノドデカン酸の残基から任意に選ばれる同一または異なる 1 もしくは数個の残基が欠失、置換または付加されていてもよい。} で表され、変異 P53蛋白質 のDNA 結合活性を回復させるか、または、変異 P53蛋白質 のP53蛋白質 依存性の転写活性を回復させる環状構造を持つペプチドおよびその薬理的に許容される塩。

2. 環状構造が X^p および X^q の間で $S-S$ 、 $S-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-$

$C_6H_4-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-CO$ 、 $CO-NH$ 、 $NH-CO$ 、 $O-CO$ 、または $CO-O$ 結合によって形成される請求項 1 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

3. X^p ($n_p = 1$) が、N末端残基であり、 X^q ($n_q = 1$) がC末端残基である請求項 2 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

4. X^p ($n_p = 1$) が N 末端残基以外の配列中の残基であり、 X^q ($n_q = 1$) が C 末端残基以外の配列中の残基である請求項 2 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。
5. X^p ($n_p = 1$) が N 末端残基以外の配列中の残基であり、 X^q ($n_q = 1$) が C 末端残基である請求項 2 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。
6. X^p ($n_p = 1$) が N 末端残基であり、 X^q ($n_q = 1$) が C 末端残基以外の配列中の残基である請求項 2 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。
7. X^p ($n_p = 1$) が X^1 であり、 X^q ($n_q = 1$) が X^{17} である請求項 3 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。
8. X^p ($n_p = 1$) が X^1 であり、 X^q ($n_q = 1$) が X^{17} である請求項 6 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。
9. X^p ($n_p = 1$) が X^1 であり、 X^q ($n_q = 1$) が X^{16} である請求項 3 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。
10. X^p ($n_p = 1$) が N 末端残基であり、 X^q ($n_q = 1$) が X^8 である請求項 6 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。
11. X^p ($n_p = 1$) が X^8 であり、 X^q ($n_q = 1$) が X^{14} である請求項 4 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。
12. X^p ($n_p = 1$) が X^3 であり、 X^q ($n_q = 1$) が C 末端残基である請求項 5 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。
13. X^p ($n_p = 1$) が X^3 であり、 X^q ($n_q = 1$) が C 末端残基以外である請求項 4 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。
14. X^p ($n_p = 1$) が N 末端残基であり、 X^q ($n_q = 1$) が X^{11} である

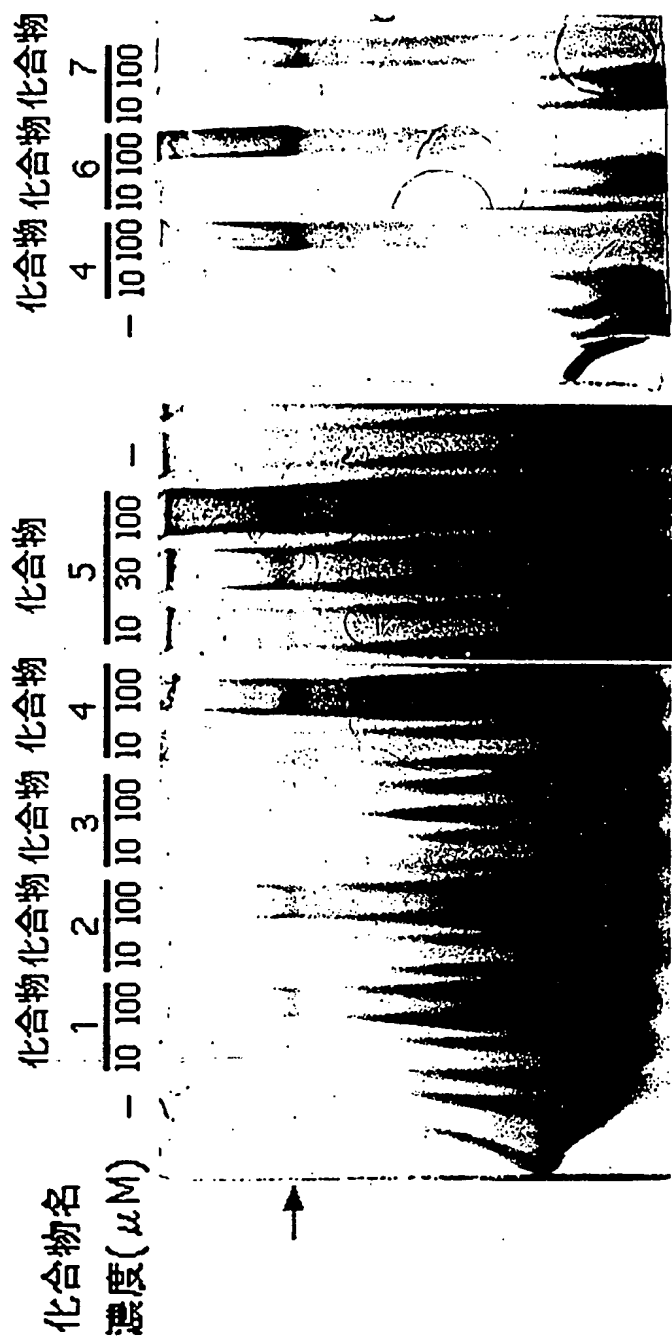
請求項 6 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

15. 配列番号 4～7、16～32 で表されるアミノ酸配列において、配列中、請求項 1 において X^i で表される有機酸もしくはアミノ酸の残基または 12-アミノドデカン酸の残基から任意に選ばれる同一または異なる 1 もしくは数個の残基が欠失、置換または付加されていてもよい請求項 1 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

16. 配列番号 4～7、16、19、25～32 で表されるアミノ酸配列において、配列中、請求項 1 において X^i で表される有機酸もしくはアミノ酸の残基または 12-アミノドデカン酸の残基から任意に選ばれる同一または異なる 1 もしくは数個の残基が欠失、置換または付加されていてもよい請求項 15 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

1 / 7

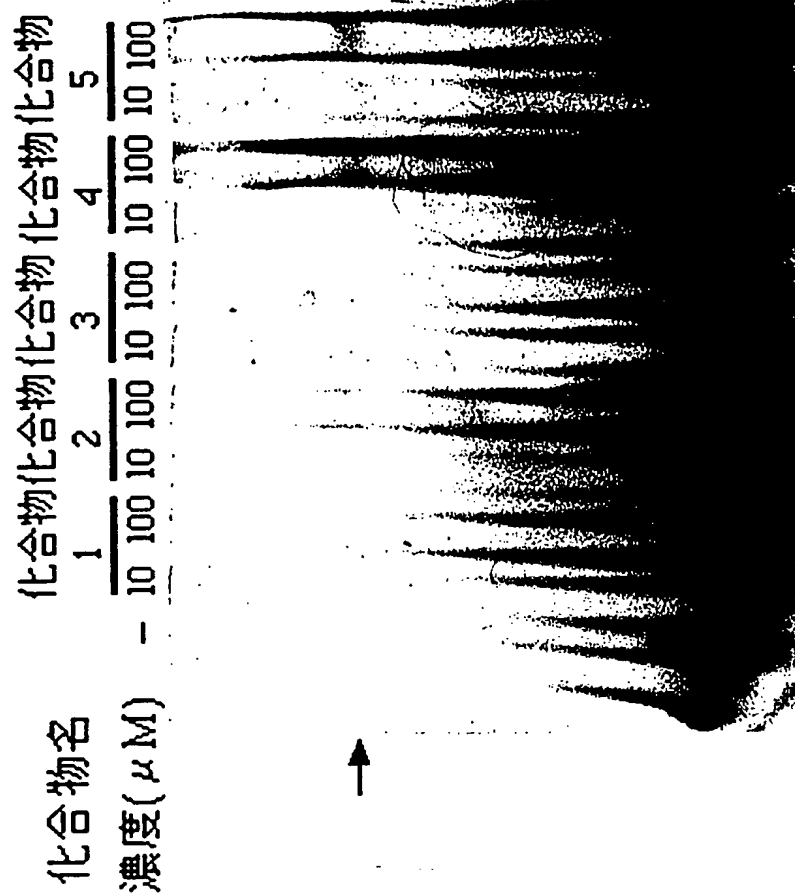
図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 7

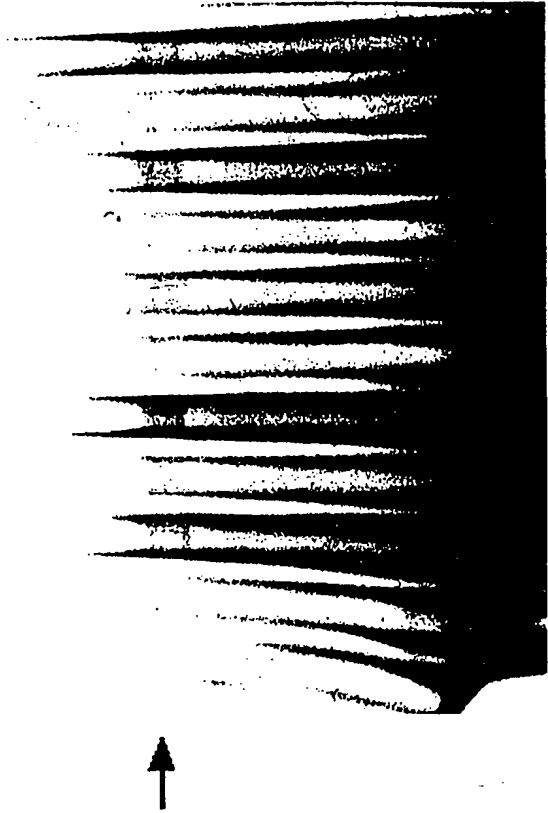
図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

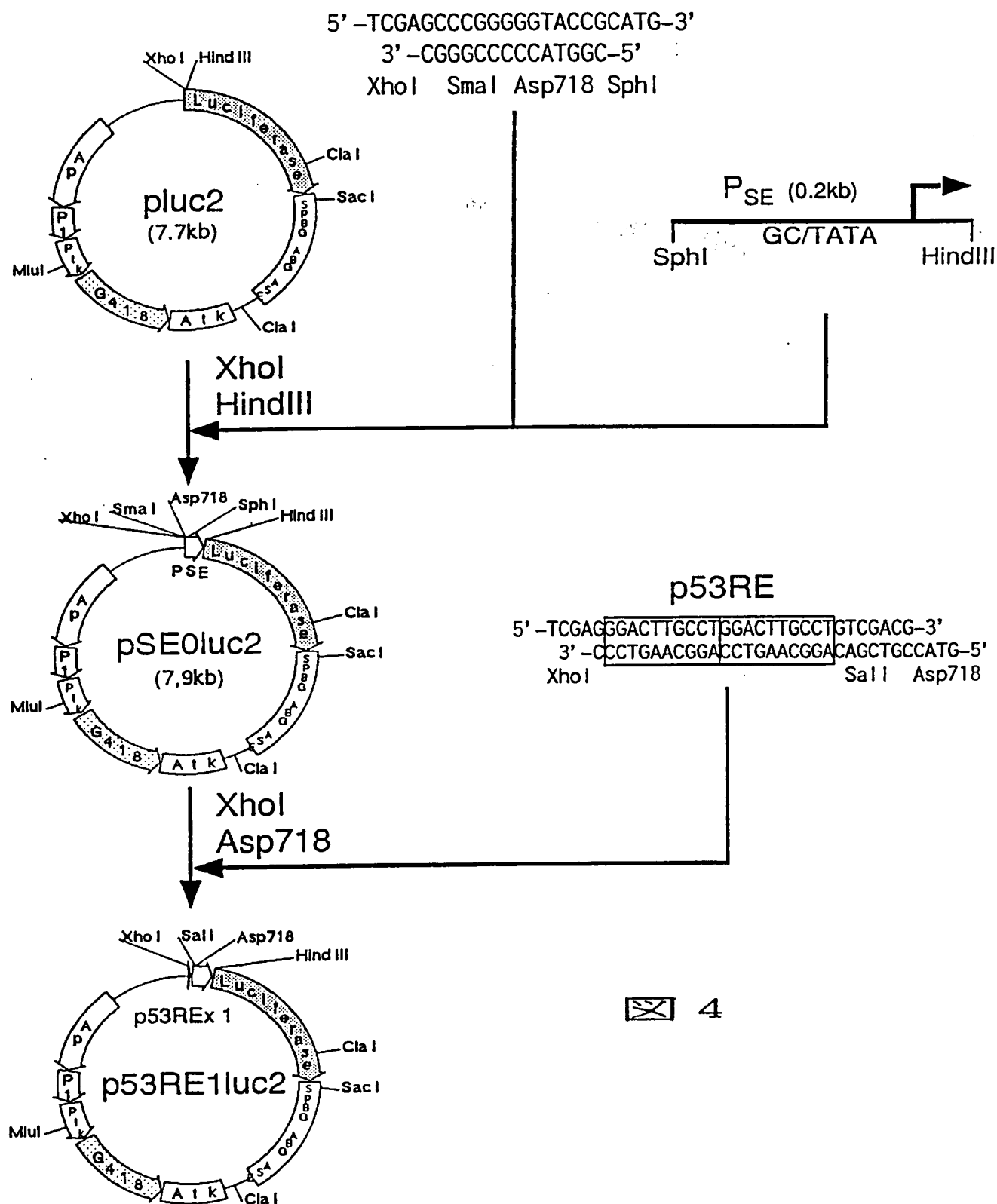
図3

化合物名	化合物化合物化合物化合物化合物									
	1	2	3	4	5					
濃度(μM)	-	10	100	10	100	10	100	10	100	100



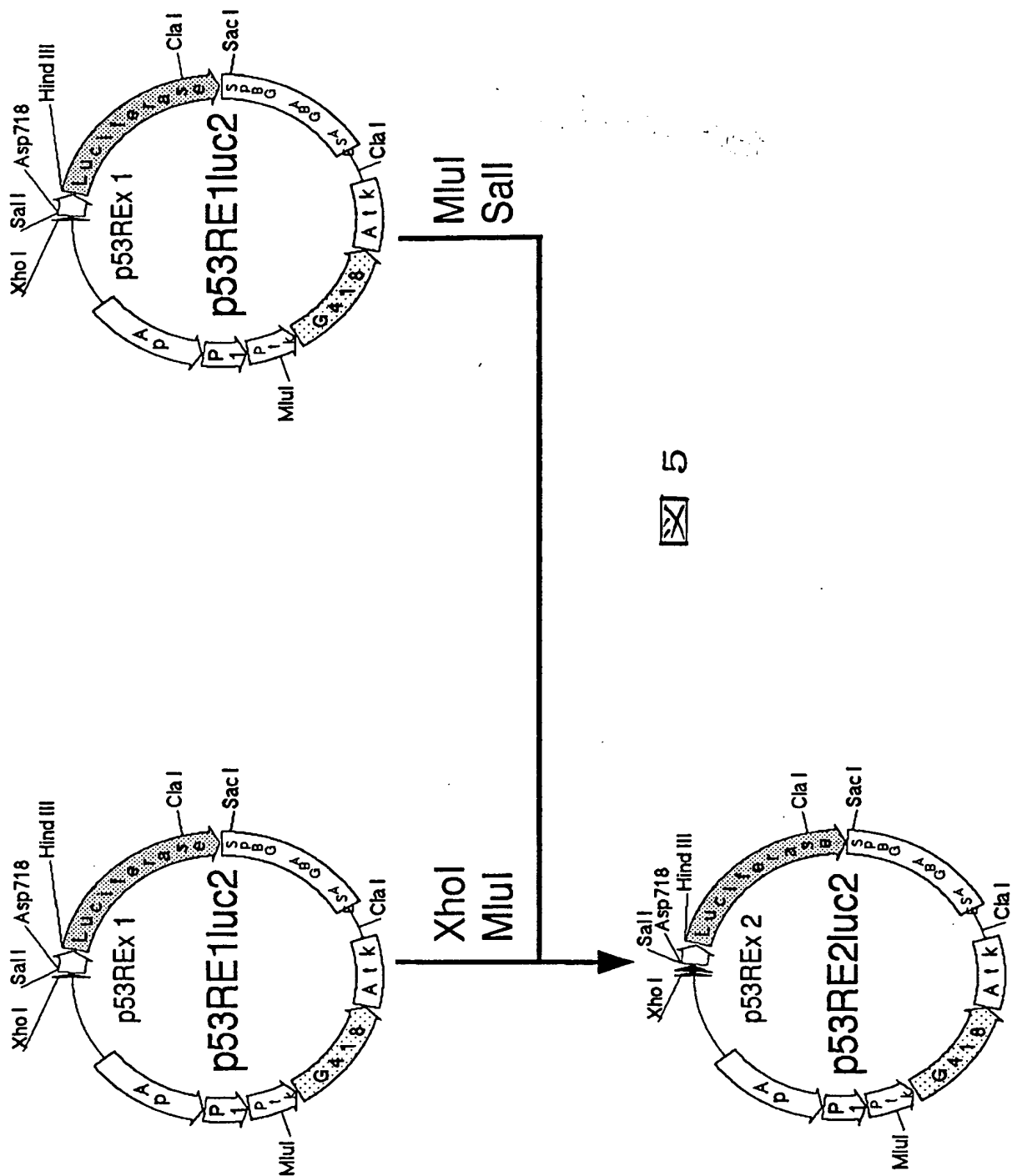
THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 7



THIS PAGE BLANK (USPTO)

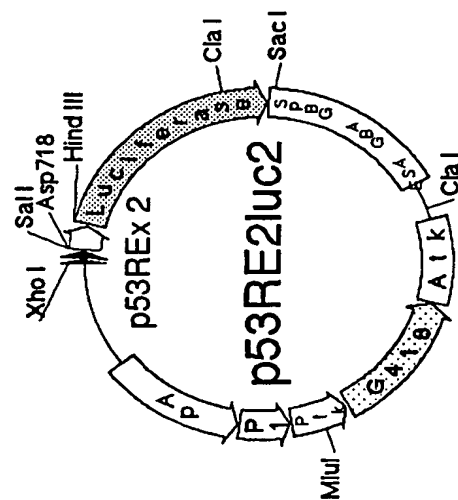
5 / 7



5

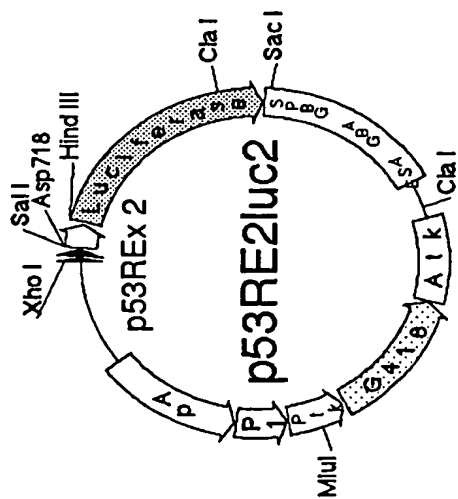
THIS PAGE BLANK (USE

6 / 7

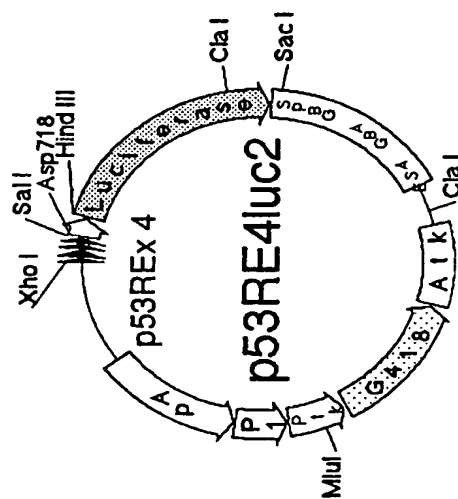


MluI
SalI

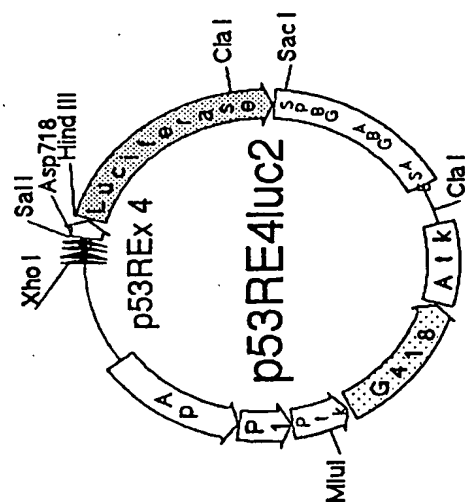
6



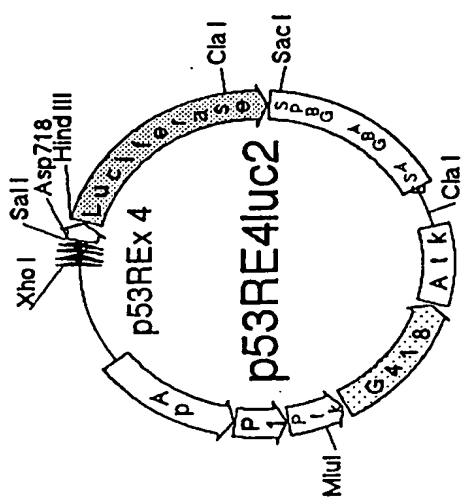
XhoI
MluI



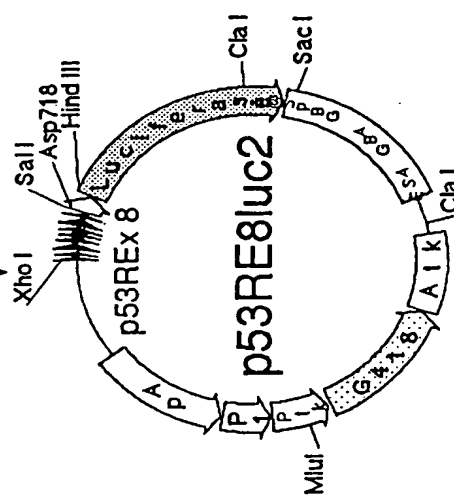
THIS PAGE BLANK (USPTO)



Milui **Sail**



Xhol
Mlul



𠂇

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02148

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K14/82 // C12N15/09, A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K14/82, A61K38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 96/25434, A1 (BAYER CORP.), August 22, 1996 (22. 08. 96) & EP, 809655, A1	1-16
A	WO, 97/14794, A1 (UNIV. DUNDEE), April 24, 1997 (24. 04. 97) & AU, 9673174, A	1-16
A	SELIVANOVA, Galina et al., "Restration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain", Nat. Med. (N.Y.), 1997, 3(6), 632-638	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
July 23, 1998 (23. 07. 98)

Date of mailing of the international search report
August 4, 1998 (04. 08. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C 07 K 14/82 // C 12 N 15/09, A 61 K 38/17

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C 07 K 14/82 , A 61 K 38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 96/25434, A1 (BAYER CORP.) 22. 8月. 1996 (22. 08. 96) & EP, 809655, A1	1-16
A	WO, 97/14794, A1 (UNIV. DUNDEE) 24. 4月. 1997 (24. 04. 97) & AU, 9673174, A	1-16
A	SELIVANOVA, Galina et al. "Restration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain", Nat. Med. (N. Y.), 1997, 3(6), 632-638	1-16

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 07. 98

国際調査報告の発送日

04.08.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤原 浩子

4 H

9155

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

THIS PAGE BLANK (USPTO)